

# **Das Bakterioplankton im Westlichen Mittelmeer.**

Analyse der taxonomischen Struktur freilebender und  
partikelgebundener bakterieller Lebensgemeinschaften mit  
mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden.

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

**D i s s e r t a t i o n**

von **Ingo Fritz**

aus **Heppenheim a. d. Bergstraße**

1. Referent: Priv. Doz. Dr. M. G. Höfle
2. Referent: Prof. Dr. K. N. Timmis

*Für Dich.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>7</b>
2.1 DIE PROBENNAHME .....	7
2.1.1 Das Ökosystem – Beschreibung der Probenahme-stellen .....	7
2.1.2 Probenahme.....	8
2.1.3 Aufbereitung der Wasserproben .....	10
2.1.3.1 Fraktionierte Isolierung.....	10
2.1.3.2 Fraktionierte Filtration .....	11
2.1.3.2.1 Aufbau des Filtrationsgestelles .....	11
2.1.4 Hintergrundparameter.....	11
2.2 MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN.....	12
2.2.1 Allgemeines.....	12
2.2.1.1 Verwendete Nährmedien.....	12
2.2.1.2 Verwendete Bakterienstämme.....	15
2.2.2 Bestimmung der Colony Forming Units .....	17
2.2.3 Kultur von Mikroorganismen .....	17
2.2.3.1 Isolierung von Mikroorganismen .....	17
2.2.3.2 Gewinnung von Biomasse.....	18
2.2.3.3 Konservierung der Isolate .....	18
2.2.3.4 Physiologische Tests .....	19
2.2.3.4.1 Temperaturanspruch .....	19
2.2.3.4.2 Salztoleranz.....	19
2.2.3.4.3 Substratverwertungstests .....	19
2.2.3.4.3.1 API - Teststreifen.....	19
2.2.3.4.3.2 BIOLOG .....	20
2.2.3.4.3.3 Auswertung der Substratverwertungstests .....	20
2.2.3.4.4 Enzymatisches Screening .....	22
2.2.3.4.4.1 Katalase und Oxidase .....	22
2.2.3.4.4.2 API ZYM Test.....	22
2.2.3.4.4.3 Andere erfaßte Enzymaktivitäten .....	23
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN .....	23
2.3.1 Analyse der Isolate .....	23
2.3.1.1 Low-molecular-weight RNA Profile.....	23
2.3.1.1.1 Extraktion von RNA aus Isolaten .....	23
2.3.1.1.1.1 RNA - Extraktion .....	23
2.3.1.1.1.2 RNA – Konzentrationsbestimmung durch UV - Spektrometrie.....	25
2.3.1.1.2 Elektrophorese der LMW – RNA Profile .....	25

---

2.3.1.1.2.1	Elektrophoresesystem.....	25
2.3.1.1.2.2	Behandlung der Glasplatten.....	26
2.3.1.1.2.3	Herstellung von Polyacrylamidgelen.....	26
2.3.1.1.2.4	Herstellung des Molekulargewichtsstandards.....	27
2.3.1.1.2.5	Vorbereiten der Proben für die Elektrophorese.....	28
2.3.1.1.2.6	Elektrophoresebedingungen.....	28
2.3.1.1.2.7	Silberfärbung der Gele.....	29
2.3.1.1.2.8	Dokumentation.....	30
2.3.1.1.3	Computergestützte Auswertung der LMW RNA – Profile.....	32
2.3.1.2	16S rRNA - Gensequenzierung.....	34
2.3.1.2.1	Technik der Sequenzierung von 16S rRNA – Genen.....	34
2.3.1.2.1.1	Verwendete Primer.....	34
2.3.1.2.1.2	Zellysis zur Gewinnung eines DNA – haltigen Zellysates.....	34
2.3.1.2.1.3	PCR – Amplifikation des 16 S rRNA – Gens.....	35
2.3.1.2.1.4	Kontrolle der PCR durch Agarose – Gelelektrophorese.....	36
2.3.1.2.1.5	Aufreinigung der PCR - Amplifikationsprodukte.....	37
2.3.1.2.1.6	Sequenzierung.....	37
2.3.1.2.1.7	Auswertung der 16S rRNA Gensequenzen.....	38
2.3.2	<i>Analyse der Umweltproben.....</i>	<i>39</i>
2.3.2.1	Kombinierte DNA – RNA Extraktion.....	39
2.3.2.1.1	Allgemeines.....	39
2.3.2.1.2	Methodik.....	40
2.3.2.2	Fluorimetrische Messung der DNA - RNA Konzentration.....	42
2.3.2.2.1	Fluorimetrische Messung zur Kalibrierung der fraktionierten DNA – RNA Konzentration.....	42
2.3.2.2.2	Fluorimetrische Messung extrahierter Nucleinsäuren aus marinen Umweltproben.....	43
2.3.2.3	LMW – RNA Profile der Umweltproben.....	44
2.3.2.3.1	Elektrophoresesysteme und Gelvorbereitung.....	44
2.3.2.3.2	Radioaktive Markierung von RNA mit T4 RNA Ligase.....	45
2.3.2.3.3	Herstellung radioaktiver Molekulargewichtsstandards.....	45
2.3.2.4	Denaturierende Gradienten – Gelelektrophorese (DGGE).....	46
2.3.2.4.1	Analytische DGGE.....	46
2.3.2.4.1.1	Beschreibung der Methodik.....	46
2.3.2.4.1.2	Verwendete Primer.....	48
2.3.2.4.1.3	Vorbereitung der DNA - Proben zur PCR – Amplifikation.....	48
2.3.2.4.1.4	PCR-Amplifikation der 16 S rRNA Gene aus Umwelt-DNA.....	49
2.3.2.4.1.5	Reverse Transcriptase – PCR (RT - PCR).....	50
2.3.2.4.1.6	Vorbereitung der PCR – Proben zur DGGE.....	52
2.3.2.4.1.7	Erstellen von Gelen zur DGGE.....	52
2.3.2.4.1.8	Elektrophoresebedingungen.....	54
2.3.2.4.1.9	Färbung der analytischen Gele.....	55
2.3.2.4.1.10	Computergestützte Auswertung der DGGE-Profile.....	55
2.3.2.4.2	DGGE zum Ausschneiden von Gelbanden.....	56
2.3.2.4.2.1	Beschreibung der Methodik.....	56
2.3.2.4.2.2	Erstellen von BAC-Gelen.....	56



2.3.2.4.2.3 Färbung der präparativen Gele .....	57
2.3.2.4.2.4 Elution und Fällung von ausgeschnittenen DGGE – Banden .....	57
2.3.2.4.2.5 Reamplifikation eluierter DNA .....	58
2.3.2.4.2.6 Kontroll - DGGE der PCR-Produkte gegen Umweltproben .....	58
2.3.2.4.2.7 Sequenzierung ausgeschnittener, reamplifizierter Gelbanden .....	58
2.3.3 SSCP – Analysen .....	58
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>61</b>
3.1 UNTERSUCHUNG DER ISOLATE.....	61
3.1.1 Bestimmung der Colony Forming Units .....	63
3.1.1.1 Oligotrophe Station S2 .....	64
3.1.1.2 Eutrophe Station S1 .....	65
3.1.2 Definition der Nomenklatur für bakterielle Isolate.....	69
3.1.3 LMW – RNA – Profile.....	70
3.1.3.1 Optimierung der computergestützten Auswertung .....	70
3.1.3.1.1 Das „Clusteranalyse – Problem“ bei LMW – RNA – Profilen .....	70
Evaluation einer Identifikationsmethode .....	71
Bestimmungsschlüssel .....	73
Beispielsuche.....	74
Nomenklatur der Elemente des Bestimmungsschlüssels .....	75
Bestimmungsschlüssel .....	79
Zwei Banden im Bereich 135 - 115 nt .....	79
Eine Bande (5S - rRNA) im Bereich 135 - 115 nt .....	82
5S rRNA mit 122 nt Größe.....	82
5S rRNA mit 121 nt Größe.....	85
5S rRNA mit 120 nt Größe.....	88
5S rRNA mit 118 nt Größe.....	91
5S rRNA mit 117 nt Größe.....	95
5S rRNA mit 116 nt Größe.....	95
5S rRNA mit $\leq 115$ nt Größe.....	95
3.1.4 Sequenzierung der 16S rRNA - Gene.....	97
3.1.5 16S rRNA-Gen Sequenzen .....	103
3.1.5.1 Gruppierung von 16 S rRNA-Gensequenzen .....	104
3.1.5.1.1 Taxon Alpha – Proteobakterien .....	104
3.1.5.1.2 Taxon Gamma – Proteobakterien .....	104
3.1.5.1.3 Taxon <i>Cytophaga</i> / <i>Flavobakterium</i> / <i>Bacteroides</i> .....	107
3.1.5.1.4 Taxon <i>Actinobacteria</i> .....	107
3.1.5.1.5 Taxon <i>Firmicutes</i> (Gram Positive Bakterien) mit niedrigem G+C - Gehalt .....	110
3.1.5.1.6 Eukaryotische Isolate.....	111
3.1.6 Taxonomische und in situ - Verteilung der OTUs.....	111
3.1.6.1 Verteilung der OTUs auf taxonomische Gruppen .....	112
3.1.6.2 Verteilung der OTUs auf die Stationen .....	113
3.1.6.3 Tiefenabhängige Verteilung der OTUs .....	118
3.1.6.4 Verteilung der OTUs auf die Fraktionen.....	119

3.1.6.5	Verteilung der OTUs auf unterschiedliche Isolationsmedien .....	122
3.1.7	<i>Taxonomische Charakterisierung ausgewählter Isolate der Gattung Brevundimonas</i> .....	123
3.2	UMWELTPROBEN .....	137
3.2.1	<i>Fraktionierte DNA-RNA Extraktion</i> .....	137
3.2.1.1	Optimierung .....	138
3.2.1.1.1	Detergenzien .....	138
3.2.1.1.2	Extraktionseffizienz .....	139
3.2.1.1.3	PCR-Amplifikation .....	141
3.2.1.1.4	RT-PCR-Amplifikation .....	144
3.2.1.1.5	Validierung der Extraktionsmethode durch Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese .....	146
3.2.2	<i>Protokoll der DNA – RNA – Extraktion</i> .....	149
3.2.3	<i>DNA – und RNA – Konzentrationen der Umweltproben</i> .....	151
3.2.4	<i>Kultivierungsunabhängige Charakterisierung mariner bakterieller Lebensgemeinschaften</i> .....	156
3.2.5	<i>Analyse der niedermolekularen RNA Profile</i> .....	156
3.2.6	<i>Analyse der Struktur mariner bakterieller Lebensgemeinschaften durch Denaturierende Gradienten-Elektrophorese (DGGE)</i> .....	161
3.2.6.1	Analytische DGGE-Gele .....	161
3.2.6.2	Bestimmung des optimalen Primerpaares .....	161
3.2.6.3	Bestimmung des optimalen Gradienten .....	163
3.2.6.4	Bestimmung der optimalen Laufzeit .....	164
3.2.7	<i>DGGE - Analyse der 16S rRNA Genfragmente von Isolaten</i> .....	164
3.2.8	<i>Analyse der Bandenmuster aus amplifizierter Umwelt-RNA</i> .....	167
3.2.8.1	Partikelgebundene Fraktion Station S1 .....	171
3.2.8.2	Partikelgebundene Fraktion Station S2 .....	171
3.2.8.3	Freilebende Fraktion Station S1 .....	171
3.2.8.4	Freilebende Fraktion Station S2 .....	172
3.2.9	<i>Sequenzierung ausgeschnittener DGGE-Banden</i> .....	172
3.2.9.1.1	Vergleich des Bandenmusters reamplifizierter Banden mit Umweltproben .....	173
3.2.9.1.2	Analyse der Sequenzen aus reamplifizierten Banden .....	173
3.2.10	<i>SSCP - Analyse</i> .....	179
3.2.10.1	SSCP – Analyse der Genfragmente aus Umwelt – DNA .....	179
3.2.10.2	Vergleich zwischen den 16S rRNA - Genfragmenten aus Isolaten und Umwelt – DNA .....	183
3.2.10.2.1	SSCP - Analyse von 16S rRNA Genfragmenten aus Isolaten .....	183
3.2.10.2.2	Vergleich der 16S rRNA Genfragmente von Isolaten und Umwelt – DNA .....	185
3.2.10.3	SSCP – Analyse reamplifizierter DGGE - Banden .....	191
3.2.11	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Analysen von Umweltnucleinsäuren</i> .....	194
4	<b>DISKUSSION</b> .....	197
4.1	FRAGESTELLUNG .....	197
4.2	UNTERSUCHUNG DER TAXONOMIE DER ISOLATE MIT MOLEKULARBIOLOGISCHEN METHODEN .....	197
4.2.1	<i>Methodik der computergestützten Auswertung von LMW-RNA-Profilen</i> .....	198
4.2.2	<i>Vergleich der LMW-RNA Profile und der 16S rRNA -Gensequenzen</i> .....	200
4.2.3	<i>Möglichkeiten und Grenzen des Screenings von Umweltisolaten durch LMW-RNA Profile</i> .....	202
4.2.4	<i>Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen von Isolaten mit Sequenzen der Genbank</i> .....	205

---

4.2.4.1	Referenzstämme .....	205
4.2.4.1.1	Alpha – Proteobakterien .....	205
4.2.4.1.1.1	Erythrobacter / Sphingomonas.....	205
4.2.4.1.1.2	Brevundimonas.....	206
4.2.4.1.1.3	Mycoplasma .....	206
4.2.4.1.2	Gamma – Proteobakterien .....	206
4.2.4.1.3	Cytophaga / Flavobacterium.....	207
4.2.4.1.4	Actinobacteria und Firmicutes (Niedrig – G+C).....	207
4.2.4.1.5	Fungi / Eukaryota .....	208
4.2.4.2	Phänotypische Charakterisierung der Isolate der Gattung Brevundimonas.....	209
4.2.4.3	Genbank mediterraner Klone von Dr. Richard Christen .....	211
4.2.4.4	Sequenzen aus eluierten DGGE – Banden .....	214
4.2.4.4.1	Plastiden / Cyanobakterien .....	215
4.2.4.4.2	Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroides – Phylum.....	217
4.2.4.4.3	Alpha – Proteobakterien .....	219
4.2.4.4.4	Gamma – Proteobakterien .....	221
4.2.4.4.5	Planctomyces.....	225
4.2.4.4.6	Gram – Positive Bakterien.....	226
4.2.5	Quantifizierung der Diversität.....	227
4.2.5.1	Bestimmung der Coverage .....	227
4.2.5.2	Bestimmung der Anzahl maximal isolierbarer OTUs .....	232
4.2.5.3	Diversitäts – und Ähnlichkeitsindices .....	236
4.2.5.3.1	Definitionen.....	236
4.2.5.3.1.1	Diversitäts – Indices .....	237
4.2.5.3.1.2	Ähnlichkeits-Indices:.....	238
4.2.5.3.2	Diversitäts – Indizes .....	238
4.2.5.3.2.1	Analyse OTU – abhängiger Diversitätsindizes .....	240
4.2.5.3.2.2	OTU – unabhängige Diversitätsindices .....	243
4.2.5.3.2.3	Korrelationen der Diversitätsindices.....	247
4.2.5.3.3	Ähnlichkeits – Indices .....	248
4.3	DIREKTE UNTERSUCHUNG PELAGISCHER UMWELTPROBEN .....	251
4.3.1	Bestimmung der Colony forming units (CFUs) .....	251
4.3.2	Extraktion von DNA und RNA aus Umweltproben.....	253
4.3.3	DNA – und RNA – Konzentrationen aus Umweltproben .....	257
4.3.4	Molekularbiologische Analysen mikrobieller Lebensgemeinschaften .....	266
4.3.4.1	Vergleich von 5S rRNA-, DGGE- und LMW-RNA-Profilen .....	266
4.3.4.2	Vergleich der Ergebnisse aus DGGE – und SSCP - Analysen.....	269
4.3.5	Artefakte bei PCR-Amplifikation und Sequenzierung von Umwelt-DNA.....	270
4.3.5.1	Chimärenbildung und Heteroduplex –Bildung.....	270
4.3.5.2	Selektive Amplifikation durch Primerselektivität .....	272
4.4	WELCHE ORGANISMEN SIND IM ÖKOSYSTEM ABUNDANT ? .....	272
4.4.1	Reflektiert die Abundanz der Isolate eine Abundanz im Ökosystem ? .....	272
4.4.2	Wie unterscheiden sich freilebende und partikelgebundene mikrobielle Biozönosen ? .....	275

---

4.4.3	<i>Gibt es Unterschiede zwischen den bakteriellen Lebensgemeinschaften der eutrophen und der oligotrophen Station ?</i> .....	277
4.4.4	<i>Verändert sich die taxonomische Struktur mikrobieller Biozönosen mit zunehmender Tiefe ?</i> ...	278
4.4.5	<i>Korrelationen mit physikalischen und chemischen Parametern</i> .....	281
4.4.6	<i>Was spielte sich im Ökosystem ab ?</i> .....	282
4.5	SCHLUßWORT .....	282
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	285
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	288
7	<b>ANHANG</b> .....	303
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	315
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	319

# 1 Einleitung

Die Erde ist ein blauer Planet (Ott, 1996). Nahezu drei Viertel ihrer Oberfläche (70,8 %,  $361 \times 10^6 \text{ km}^2$ ) sind vom Meer bedeckt (Ott, 1996). Etwa  $1,2 \times 10^{29}$  prokaryotische Zellen bewohnen die Ozeane und Meere dieses Planeten, wovon sich  $3,6 \times 10^{28}$  Zellen in den oberen 200 m der Wassersäule bei einer mittleren Konzentration von etwa  $5 \times 10^8$  Zellen je Liter Seewasser verteilen. In den darunterliegenden Wasserschichten leben insgesamt  $6,5 \times 10^{28}$  Zellen, welche sich, bei einer mittleren ozeanischen Tiefe von 3800 m, auf eine Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen je Liter verteilen (Whitman, Coleman & Wiebe, 1998). Whitman et al. (1998) schätzen, daß lediglich  $2,9 \times 10^{27}$  oder etwas mehr der in den oberen 200 m vorkommenden Zellen autotrophe Cyanobakterien sind. Ein großer Teil der marinen Mikroorganismen ist folglich heterotroph und somit zur Deckung des Energie – und Nährstoffbedarfes auf organische Substanzen angewiesen.

Organische Substanzen liegen im Ozean in zwei Fraktionen vor, als gelöste (dissolved organic matter, DOM) und als partikelförmige Materie (particulate organic matter, POM). Das Bakterioplankton spielt eine Schlüsselrolle bei der Umsetzung dieser beiden Formen organischer Substanzen. Mikrobielle Konsortien, bestehend aus Bakterien und Protozoen, sind verantwortlich für den größten Teil der Dekompostierung von mariner POM. Es ist anzunehmen, daß im freien Wasserkörper der Weltmeere ein großer Teil des gesamten Kohlenstoffflusses über heterotrophe Aktivitäten von Mikroben umgesetzt wird.

Partikelförmige organische Materie wird unterteilt in sedimentierendes Material und nicht sedimentierendes Material. Letzteres ist üblicherweise klein mit Durchmessern  $< 1 \mu\text{m}$ , während sedimentierendes Material sehr unterschiedliche Größen und verschiedenartige Konsistenzen aufweisen kann. Stachowitsch (1990) teilt marine Aggregate nach ihrer Konsistenz und ihrem Erscheinungsbild in fünf Klassen ein: ‚macroflocs‘, ‚stringers‘, ‚clouds‘, ‚creamy surface layers‘ und ‚gelatinous surface layers‘. Typische Bestandteile großer Partikel mit Durchmessern über 0,5 mm sind, in veränderlichen Gewichtsanteilen, Überreste einzelliger Algen, Faeces planktonischer Organismen, Mucus von Larvacaengehäusen und Detritus. Diese Partikel treten praktisch überall im Meerwasser auf und sorgen durch ihr Absinken für einen Nettoexport organischer Substanzen vom oberflächennahen Wasser in tiefere Wasserschichten und in das Sediment (Turley & Lochte, 1990). Durch diese biologische Pumpe werden netto schätzungsweise 10 % der Primärproduktion aus den oberen Wasserschichten exportiert (Newell & Turley, 1988). Horizontale Bewegungen von Partikeln im Wasserkörper können durch angeheftete Gasblasen beeinflußt werden, die durch Stoffwechselaktivitäten angehefteter Organismen gebildet werden und neben einer Verlangsamung des Absinkprozesses sogar zum Aufsteigen von Partikeln führen können (Riebesell, 1992).

Makroskopische Partikel des Oberflächenwassers entstehen durch Koagulation kleinerer Partikel unterschiedlicher Herkunft. Ursachen für die Aggregation können physikalische (Riebesell, 1991a) oder biologische (Riebesell, 1991b) Prozesse sein. McCave (1984) faßt

vier Mechanismen zusammen, die Partikel in große Nähe zueinander bringen und so zu einer Aggregation führen können: 1) Brownsche Molekularbewegung, 2) laminare und turbulente Scherkräfte, 3) unterschiedliches Sinkverhalten, resultierend in hohen Partikeldichten in bestimmten Zonen der Wassersäule und 4) Aufnahme von Partikeln durch Tiere und Ausscheiden als Faezes. Die Bestandteile mariner Partikel werden einerseits durch Primärproduktion gebildet, andererseits stammen sie aus exogenem Eintrag, z.B. aus der Atmosphäre, aus Flüssen und durch Windeintrag von Material terrestrischen Ursprungs. Anorganische Partikel sind beispielsweise Staub aus Windeintrag oder im Regenwasser gelöste Substanzen. Der biologische Eintrag leitet sich aus dem Import organischen terrestrischen Materials über Wind oder Flüsse, sowie durch aufgewirbeltes oder durch Flüsse transportiertes Sediment ab. Organische Partikel mariner Herkunft sind: Tote Primärproduzenten, die z.B. nach Algenblüten häufig sind (Smetacek, 1984), (Riebesell, 1991a), (Riebesell, 1991b), Faezes planktischer Organismen und Schleim und Gehäuse zahlreicher planktonischer Organismen, wie Pteropoden., Gastropoden, Annelidenlarven, Tintenfische und Appendicularien (Alldredge, 1976), (Davoll & Silver, 1986). Diese Gehäuse bilden makroskopische Aggregate mit Durchmessern zwischen wenigen Millimetern und 2 Metern, die wegen ihrer schleimigen Konsistenz, ihrer Zerbrechlichkeit und räumlichen Verteilung schwierig zu sammeln sind (Youngbluth, 1984), (Gorsky, Guilbert & Valenta, 1989). Etwa ein Drittel der aufgenommenen Nahrung pelagischer Organismen werden als schnell sedimentierende Faezes wieder ausgeschieden. Durch vertikale Wanderungen des Zooplanktons wird ein Teil der Ausscheidungen als frisches Material in tieferen Schichten der Wassersäule hinterlassen (Parsons, Takahasi & Hargrave, 1977).

Makroskopische Partikel werden von einer diversen Lebensgemeinschaft bewohnt, bestehend aus Bakterien, Protozoen und Phytoplankton. Die Dichten der an Partikel angehefteten Mikroorganismen übersteigen die Dichten der freilebenden Mikroorganismen im umliegenden Seewasser um ein bis zwei Größenordnungen. Eukaryotische und prokaryotische partikelgebundene Mikroorganismen tragen sukzessiv zu Aggregation und Abbau von partikelgebundenem Detritus bei (Biddanda & Pomeroy, 1988). Einen wichtigen Mechanismus der durch Mikroorganismen vermittelten Aggregatbildung stellt die Produktion von extrazellulären Mucopolysacchariden mariner Bakterien dar (Biddanda, 1985). Partikelgebundene Bakterien können Aggregate mit Hilfe von Exoenzymen lösen und somit POM in DOM überführen (Peduzzi & Herndl, 1991). Viele Spezies von Phytoplankton bilden um ihre Kolonien ebenfalls eine Mucushülle (Alldredge & Silver, 1988), die als Matrix für die Bildung von „Marine Snow“ dienen kann. Während der Anheftungsprozeß von Diatomeen ein aktiver Prozeß unter Beteiligung von Glycoproteinen ist und durch den Einsatz metabolischer Energie stattfindet (Cooksey & Wigglesworth - Cooksey, 1995), handelt es sich bei dem Anheftungsprozeß von Bakterien an Aggregate zum Teil um passive Prozesse, die durch adhäsive Eigenschaften von bakteriell und partikulärem Mucus vermittelt werden. Zum Teil existieren aber auch Hinweise auf eine aktive Rolle der Bakterien im Anheftungsprozess, wie eine häufigere Frequenz von Kapselbildungen bei partikelgebundenem im Vergleich zu freilebendem Bakterioplankton (Heissenberger, Leppard & Herndl, 1996).

Pedrós-Alió und Brock (1983) beschreiben die Vorteile der Anheftung an Partikel für Bakterien folgendermaßen: 1) hoher Nährstoffakkumulation durch Adsorption organischer Materie an Partikel, 2) Partikel stellen an sich eine Nährstoffquelle dar, 3) angeheftete Bakterien werden durch die Wassersäule transportiert und kommen in Wasserschichten mit nicht aufgebrauchten Nährstoffvorräten in Kontakt, während freilebende Bakterien sich als Kolloide verhalten und in ihren ursprünglichen Wasserschichten verbleiben, auch wenn dort die Ressourcen bereits aufgebraucht sind.

Die Anheftung von Bakterien an Partikel wird generell im aquatischen Habitat beobachtet. Der Anteil partikelgebundener Bakterien an der – prokaryotischen – Gesamtzellzahl variiert, je nach Partikelzahl, Partikelzusammensetzung, Region der Untersuchung und Nährstoffgehalt der Wasserphase, mit Werten von 0 % bis 95 % über nahezu die gesamte Breite der Skala (Hoppe, 1984). Die Wachstumsrate und die Aktivität der Mikroorganismen kann dabei durch Oberflächenanheftung beeinflusst werden (Fletcher, 1984). Besonders in nährstoffarmen, oligotrophen Gewässern können metabolische Aktivitäten, wie beispielsweise die Nitrifikation, durch Zugabe von Partikeln gesteigert werden (Underhill & Prosser, 1987). Bakterielle Biomasse hat einen stark variierenden Anteil am Gesamtgewicht des aggregierten Detritus: An der Oberfläche beträgt der bakterielle Anteil 90 %, in der Tiefe lediglich 5 % Gewichtsanteil am Detritus. Gemessen in verschiedenen Typen von Marine Snow beträgt der Anteil bakteriellen organischen Kohlenstoffs weniger als 13 % des gesamten organischen Kohlenstoffs (Simon, Alldredge & Azam, 1990). Trotzdem sind marine Partikel Orte hoher metabolischer Aktivität und beherbergen von der Wasseroberfläche bis zu Tiefseebedingungen hohe Konzentrationen an Bakterien und Protozoen (Turley, Lochte & Patterson, 1988).

Bislang sind die pelagischen Mikroumgebungen, in denen diese Stoffumsätze stattfinden, nicht ausreichend charakterisiert. Mikroorganismen und Partikel interagieren in sehr enger Weise miteinander: Partikel ermöglichen den Mikroorganismen die Kolonisierung und die räumlich dichte Besiedelung des Substrates und letztlich Interaktionen zwischen verschiedenen bakteriellen Spezies, die im freien Wasserkörper nicht möglich wären, werden aber ihrerseits nach erfolgter Kolonisierung durch Mikroorganismen physikalisch und chemisch verändert. Aggregate bilden Mikrozonen mit physikalischen und biochemischen Eigenschaften, die sich zum Teil erheblich von denjenigen der umgebenden Wassersäule unterscheiden. Geladene Partikel und Moleküle können sich an der Oberfläche der Aggregate anlagern und somit konzentriert werden. Diese Anlagerungen können nun ihrerseits wieder als Substrat für Bakterien dienen. Durch Reduktion und Oxidation von Substraten kann es zu lokalen Verschiebungen der Redoxpotentiale kommen. Auf diese Weise werden Mikronischen für an besondere physikochemikalische Bedingungen angepaßte Organismen geschaffen. Diese Organismen verändern die lokale Mikroumgebung wieder, so daß es in Folge zur Ausbildung komplexer, stratifizierter mikrobieller Biozönosen kommt. Infolgedessen können sich in Aggregaten Lebensgemeinschaften ausbilden, deren Mitglieder in spezifischen Mikrozonen Stoffwechselprozesse ausführen können, die ansonsten im freien Wasserkörper nicht ablaufen könnten. Beispielsweise benötigen zwei Prozesse des Stickstoffkreislaufes, Denitrifikation und Stickstofffixierung, reduzierte Mikroumgebungen

um ablaufen zu können (Focht & Vestraete, 1971). Analog kann es in reduzierten Mikrozonen zur Fermentation oder Methanogenese kommen (Alldredge & Cohen, 1987). Auf diese Weise kann eine *in situ* Produktion von Methan in der Pyknokline stattfinden (Sieburth, 1987).

Über die taxonomische Struktur der an diesen Umsätzen beteiligten mikrobiellen Lebensgemeinschaften ist wenig bekannt. Vor allen Dingen ist unklar, ob freilebende und partikelgebundene Bakterienfraktionen eine ähnliche oder eine unterschiedliche Spezieszusammensetzung besitzen und ob ein „Austausch“ zwischen diesen beiden Fraktionen stattfindet, z.B. durch Organismen mit sessilen und mobilen Lebenszyklusabschnitten. Ungeklärt ist ebenfalls die Frage, welche Organismengruppen *in situ* eine hohe Abundanz besitzen sind und ob sich Stämme dieser abundanten Taxa aus Meerwasserproben isolieren und im Labor für weitere Untersuchungen kultivieren lassen.

Traditionelle mikrobiologische Techniken erlaubten eine Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften lediglich anhand von Untersuchungen von Gesamtstoffumsetzungen und anhand der Identifizierung kultivierbarer Bakterien. Mitte der 80er Jahre wurden erste experimentelle Ansätze entwickelt, die es anhand von Vergleichen ribosomaler RNAs aus Umweltproben erlaubten, Aussagen über die Identität nicht kultivierter bzw. nicht kultivierbarer Mikroorganismen zu treffen (Stahl *et al.*, 1984), (Stahl *et al.*, 1985), (Lane *et al.*, 1985), (Olsen *et al.*, 1986), (Pace *et al.*, 1986). Diese ersten Veröffentlichungen beruhten auf einer Extraktion nativer 5S ribosomaler RNA aus Umweltproben und deren Sequenzierung mit RNasen. Dieser Ansatz erwies sich jedoch nur für Ökosysteme mit geringer Biodiversität als praktikabel (Stahl *et al.*, 1985). Weitere Untersuchungen stützten sich zunächst auf Untersuchungen nativer 16S ribosomaler RNA sowie deren Sequenzierung mit Hilfe von Reverser Transcriptase (Distel *et al.*, 1988) (Lane *et al.*, 1992). Durch Sequenzvergleiche von 16S rRNAs taxonomisch verschiedener Organismen und durch parallele Arbeiten zur Aufklärung der Sekundär – und Tertiärstrukturen ribosomaler RNAs wurden dann Anfang der 90er Jahre die ersten Primer ermittelt, die eine PCR - Amplifikation von 16S rRNA – Genen ermöglichten (Weisburg *et al.*, 1991) und damit die Tür zu einer raschen Routineanalyse von Genen für 16S rRNA aufstießen. Zwei Strategien zur Analyse von aus Umweltproben amplifizierten 16S rRNA – Genen wurden gebräuchlich: Zum einen wurden 16S rRNA - Gene mittels PCR aus Umweltproben amplifiziert, kloniert und Charakterisierungen mikrobieller Lebensgemeinschaften durch Klonbankanalysen durchgeführt (Giovannoni *et al.*, 1990), (Britschgi & Giovannoni, 1991), (Fuhrman, McCallum & Davis, 1993) (Schmidt, DeLong & Pace, 1991a) (Fuhrman *et al.*, 1993). Zum anderen wurden Fingerprinttechniken aus der Mutationsforschung adaptiert und für Umweltanalysen optimiert, die es erlaubten, 16S rRNA – Genfragmente taxonomisch unterschiedlicher Organismen mit unterschiedlicher Nucleinsäuresequenz, aber gleicher Größe, nach Unterschieden im Schmelzverhalten sequenzspezifisch aufzutrennen (Muyzer, de Waal & Uitterlinden, 1993), (Lee, Zo & Kim, 1996).

Die ersten Habitate, die mittels Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA – Genen aus Umweltproben charakterisiert wurden, waren pelagische Habitate der Ozeane. Die meisten dieser Studien bezogen sich dabei auf mikrobielle Biozönosen aus oligotrophen Regionen des



offenen Ozeans, beispielsweise des Oberflächenwassers der Sargasso - See (Giovannoni *et al.*, 1990), (Britschgi & Giovannoni, 1991), (Fuhrman *et al.*, 1993), das Oberflächenwasser des Zentralpazifiks nahe Hawaii (Schmidt *et al.*, 1991a) und in 100 m und 500 m Tiefe in der westkalifornischen Strömung (Fuhrman *et al.*, 1993). Ein Fokus dieser Untersuchungen lag in der kultivierungsunabhängigen Aufklärung der taxonomischen Strukturen ozeanischer bakterieller Lebensgemeinschaften. Die meisten Studien beziehen sich dabei auf freilebende mikrobielle Biozönosen, aber einige Studien beziehen auch partikelgebundene mikrobielle Lebensgemeinschaften ein (DeLong, Franks & Alldredge, 1993), (Bidle & Fletcher, 1995), (Rath *et al.*, 1999), (Acinas, Anton & Rodriguez-Valera, 1999). Der Einfluß terrestrischen Eintrages in das Ökosystem und dessen Auswirkung auf Partikelbildung sowie die taxonomische Struktur von Mikroorganismen war nicht Gegenstand der genannten Untersuchungen.

Einige allgemeine Erkenntnisse ließen sich aus diesen Untersuchungen ziehen: (1) Kultivierbare Mikroorganismen aus Umweltproben stimmen hinsichtlich ihrer 16S rRNA Gensequenzen nicht mit abundanten rRNA – Genen in molekularen Klonbanken überein (Giovannoni, Mullins & Field, 1995). Weiterhin erfassen kultivierungsabhängige Techniken nur einen kleinen Teil aller Mikroorganismen (Amann, Ludwig & Schleifer, 1995), (Bianchi & Giuliano, 1996), im Gegensatz hierzu äußert sich Pinhassi (1997). (2) Nahe verwandte Taxa wurden an weiträumig entfernten Standorten aufgefunden (Mullins *et al.*, 1995). Wurde allerdings in älteren Untersuchungen beobachtet, daß 16S rRNA – Gensequenzen aus Klonbanken in eine kleine Anzahl phylogenetisch verschiedener Gruppen fielen (Fuhrman *et al.*, 1993), (Mullins *et al.*, 1995), (Giovannoni *et al.*, 1996), so gibt es in neueren Untersuchungen auch Hinweise auf eine hohe Diversität (Rath *et al.*, 1999). Diese Unterschiede lassen sich zum Teil auf eine unterschiedlich breit gefaßte Definition phylogenetischer Gruppen bzw. taxonomischer Einheiten (OTUs) in den verschiedenen verschiedenen Veröffentlichungen zurückführen und unterstreichen den Bedarf nach einer objektiven, speziesunabhängigen Charakterisierung der Diversität.

Zahlreiche Studien charakterisierten Umweltproben lediglich entweder über Isolierung von Mikroorganismen (zahlreiche ältere Veröffentlichungen, z.B. (Austin *et al.*, 1979b); Veröffentlichungen neueren Datums: (Schut *et al.*, 1993), (Ortigosa, Garay & Pujalte, 1997), (Pinhassi *et al.*, 1997)) oder über Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA – Genen (Britschgi & Giovannoni, 1991), (Schmidt, DeLong & Pace, 1991b), (Fuhrman *et al.*, 1993), (Mullins *et al.*, 1995), (Giovannoni *et al.*, 1996), (Rappé, Kemp & Giovannoni, 1997), (Wright *et al.*, 1997), (Field *et al.*, 1997), oder über Fingerprintmethoden wie Denaturierende Gradienten – Gelelektrophorese (DGGE) bzw. 5S rRNA – Profile (Bidle & Fletcher, 1995), (Noble, Bidle & Fletcher, 1997). Wenige Studien bedienen sich einer Kombination kultivierungsabhängiger und kultivierungsunabhängiger Methoden, beispielsweise einer Kombination aus Isolierung von Mikroorganismen und Analysen von 16S rRNA – Klonbanken aus identischen Wasserproben (Benlloch, Rodriguez-Valera & Martinez-Murcia, 1995), (Suzuki *et al.*, 1997) oder DGGE – Analyse und Isolierung (Teske *et al.*, 1996).

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Struktur des Bakterioplanktons im westlichen Mittelmeer in der Ligurischen See, nahe Nizza / Frankreich. Das Oberflächen – und Tiefenwasser einer küstennahe und eine küstenferne marine Station wurden im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten EMPS – Projektes (EMPS: European Microbiology of Particulate Systems) beprobt und hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen der Bildung mariner Partikel und zwischen Struktur und Aktivität mikrobieller Lebensgemeinschaften untersucht. An diesem Projekt waren Arbeitsgruppen aus mehreren EU – Ländern beteiligt. Untersuchungsgegenstände waren 1) die räumliche und zeitliche Verteilung von Partikeln, 2) Messung von planktischen Stoffwechselaktivitäten, 3) Raten mikrobieller Abbauprozesse und Messung exoenzymatischer Aktivität, 4) die taxonomische Struktur und Diversität der Mikroorganismen sowie 5) eine Synthese der Ergebnisse, um computergestützte Modelle über mikrobielle Aktivitäten in marinen Umgebungen zu ermöglichen. In dieser Arbeit steht die taxonomische Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Mittelpunkt.

Drei Fragestellungen bildeten den Ausgangspunkt für diese Untersuchung:

- 1) Welche Unterschiede bestehen in der taxonomischen Struktur bakterieller Lebensgemeinschaften im Vergleich zwischen einem küstennahen und einem küstenfernen Standort ?
- 2) Inwiefern unterscheiden sich freilebende und partikelgebundene Lebensgemeinschaften von Mikroorganismen ?
- 3) Welche Unterschiede bestehen zwischen den kultivierbaren Vertretern bakterieller Lebensgemeinschaften und *in situ* abundanten Organismen in mikrobiellen Biozönosen. ?

Dabei sollen die mit unterschiedlichen Analysemethoden erhaltenen Ergebnisse ((1) Isolierung von Mikroorganismen, (2) Analyse von Fingerprintmustern aus Nucleinsäureextrakten mittels DGGE, SSCP und 5S rRNA – Profilanalyse und (3) Klonierung und Sequenzierung von 16S rRNA – Genen aus Nucleinsäureextrakten) qualitativ miteinander verglichen werden und der Versuch einer Quantifizierung der mikrobiellen Diversität unternommen werden. Ziele der Doktorarbeit waren es, die taxonomische Struktur der mikrobiellen freilebenden und partikelgebundenen Biozönosen aufzuklären, marine Bakterienstämme aus Meerwasserproben zu kultivieren und mit molekularbiologischen Methoden zu charakterisieren, die *in situ* – Abundanz der kultivierbaren marinen Bakterien zu bestimmen und *in situ* abundante mikrobielle Taxa zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die Probennahme

#### 2.1.1 Das Ökosystem – Beschreibung der Probennahmestellen

Durchgeführt wurden die Untersuchungen an zwei Stationen, einer küstennahen meso - eutrophen Station (im Folgenden als S1 bezeichnet) und einer küstenfernen oligotrophen Station (im weiteren Verlaufe als S2 benannt), im westlichen Mittelmeer bei Nizza / Frankreich. Die Wasserkörper der küstennahen und küstenfernen Station sind durch die horizontale, parallel zur Küstenlinie verlaufende Liguro - Provencalische Strömung physikalisch voneinander getrennt. Das bedeutet: Ein Eintrag von Nährstoffen durch aus dem Binnenland in das Meer einströmende Gewässer wirkt sich auf den Trophiegrad des küstennahen Wasserkörpers, repräsentiert durch Station S1, aus, nicht aber auf den Trophiegrad des küstenfernen Wasserkörpers, repräsentiert durch Station S2.

Station S1 (nautische Koordinaten:  $43^{\circ}37.72\text{ N} - 7^{\circ}25.85\text{ E}$ ) liegt proximal zur liguro - provencalischen Strömung und weist eine Entfernung von 5,5 nautischen Meilen (rund 10 km) zu der Küste auf, während Station S2 (nautische Koordinaten:  $43^{\circ}25.29\text{ N} - 7^{\circ}52.13\text{ E}$ ), auf der distalen Seite gelegen, 28 nautische Meilen (rund 52 km) von der Küste entfernt ist und somit auf halbem Wege zwischen dem französischen Festland und der Insel Korsika liegt. Punkt B ist ein Probennahmepunkt am Eingang der Bucht von Villefrance s. M., der seit ungefähr 40 Jahren täglich beprobt worden ist.

Die Forschungsausfahrt unter dem Codenamen „PICNIC“, die im Rahmen des EU – Projektes EMPS durchgeführt wurde, fand zwischen dem 30.03.1995 und dem 10.04.1995 statt. Dieser Zeitpunkt fiel in den Beginn der Frühjahresblüte des Phytoplanktons, so daß in den letzten Tagen der Ausfahrt ein Anstieg der mikroheterotrophen Aktivität festzustellen war.

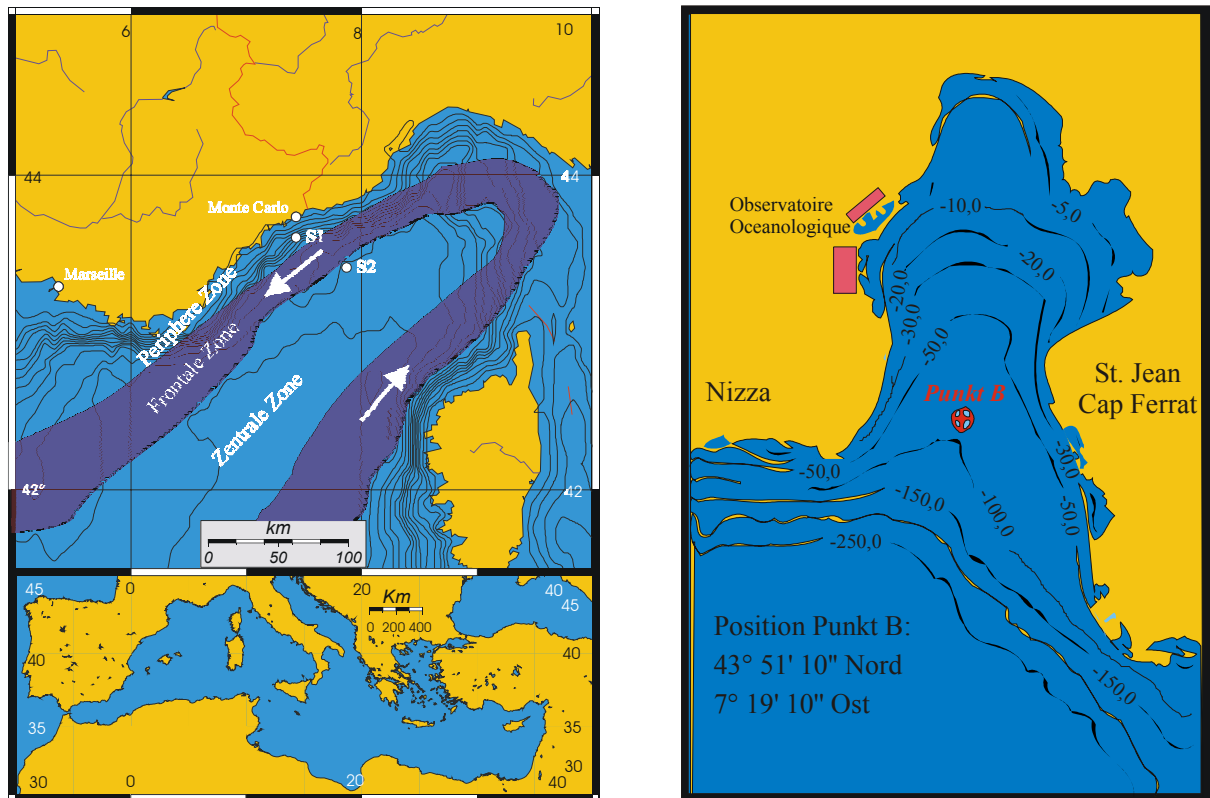
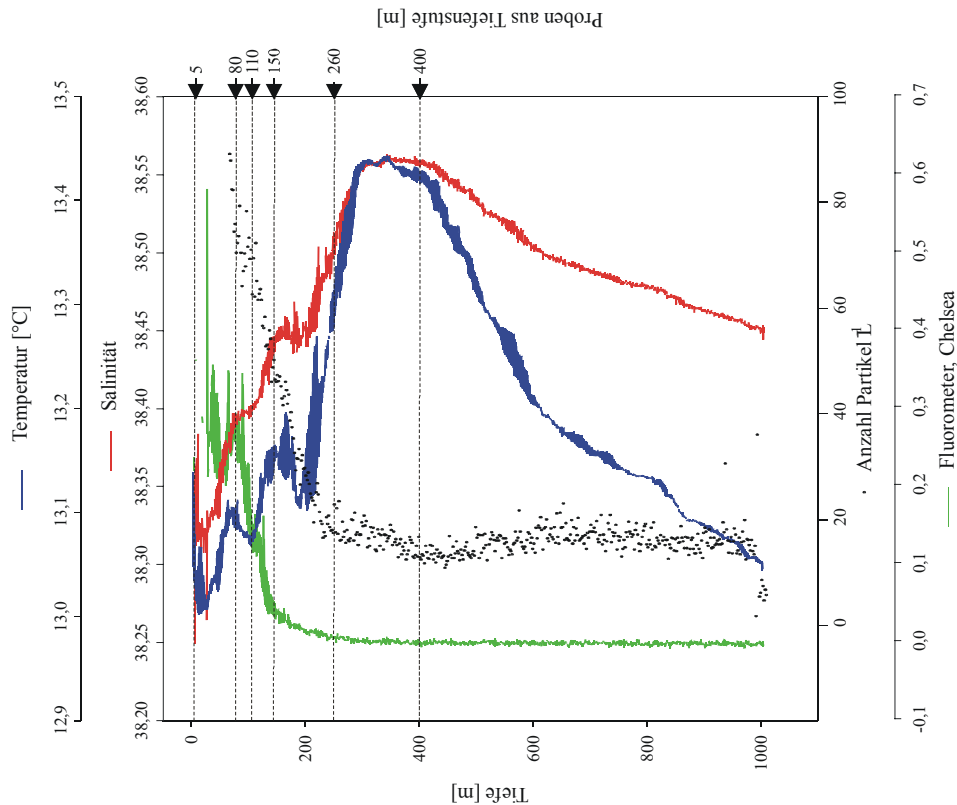


Abbildung 1: Karte mit der Position der Probennahmestellen Station S1 und S2 (linke Seite) sowie Punkt B (rechte Seite).

## 2.1.2 Probennahme

Die hydrologischen Parameter (Temperatur und Salinität) sowie die *in situ* Verteilung von Partikeln mit einer Größe zwischen 100 µm bis 1 mm wurden mit Hilfe eines Unterwasser - Video - Profiler - Prototyps gemessen (Gorsky, 1992). Wasserproben wurden an den bezeichneten Stationen S1 und S2 mit an einer Rosette montierten Niskin - Schöpfnern (Fassungsvermögen je Schöpfer: 12 l) entnommen. 6 bis 8 Liter der Wasserproben wurden in Plastikkanister abgefüllt (welche vor Beginn der Probennahme mit verdünnter HCl und anschließend dreimal mit autoklaviertem, doppelt destilliertem Wasser gespült worden waren) und anschließend für zwei bis vier Stunden bei 15 °C bis zur erfolgten Rückkehr in das Observatorium Villefrance s.M. gelagert wurden. Dort angekommen, wurden die Proben bei 4° C zwischengelagert, während unverzüglich mit der weiteren Verarbeitung der Proben begonnen wurde. Zwischen Probennahme und erfolgter Verarbeitung der letzten Wasserprobe lag eine Zeitspanne von maximal 12 Stunden.

03.04.1995 Station S2



06.04.1995 Station S1

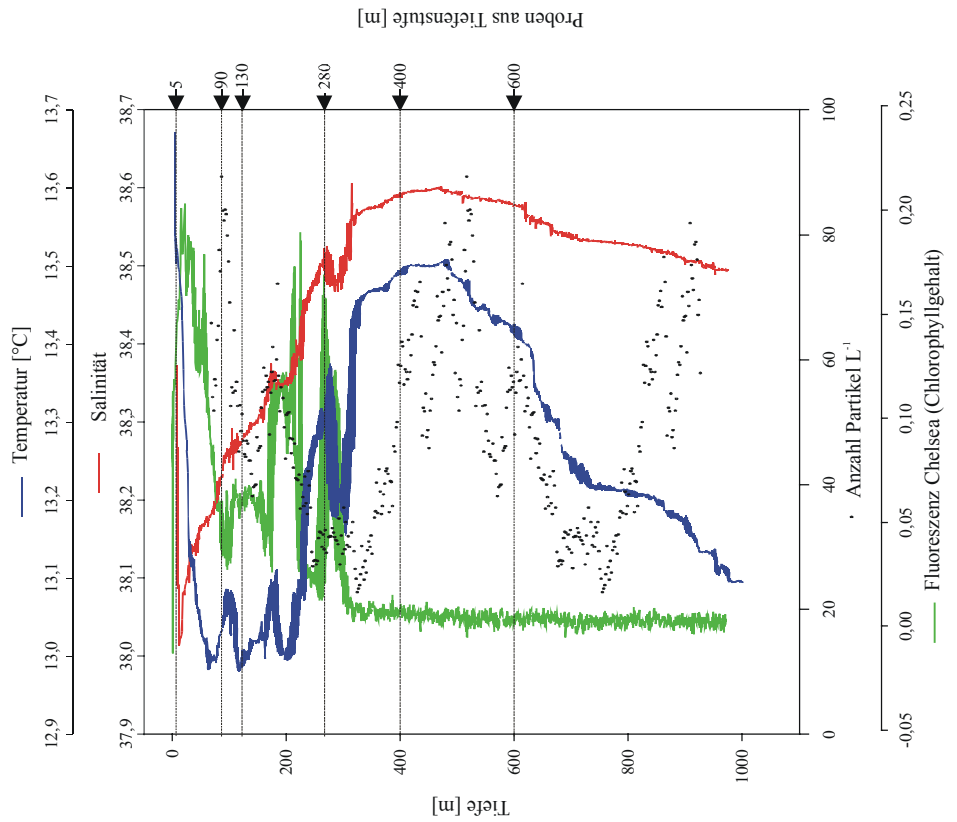


Abbildung 2 (Seite 9): Temperatur, Salinität, Partikelzahl und Chlorophyllgehalt (gemessen durch Fluoreszenz) im freien Wasserkörper an Station S1 (06.04.1995) und Station S2 (03.04.1995). Parameter wurden mit einem Videoprofiler erfaßt, zu Details siehe Text sowie (Gorsky, 1992).

## 2.1.3 Aufbereitung der Wasserproben

Von den Wasserproben wurden 200 ml in sterile Schott - Glasflaschen abgefüllt. Diese 200 ml Aliquots dienten als Ausgangsmaterial zur fraktionierten Isolation von Mikroorganismen. Der Rest der Wasserproben wurde zur fraktionierten Filtration zur Gewinnung bakterieller Biomasse aus Umweltproben eingesetzt.

### 2.1.3.1 *Fraktionierte Isolierung*

Um Aussagen zu ermöglichen, ob isolierte Bakterien im Ökosystem bevorzugt partikelgebunden oder freilebend vorkommen, wurde folgender Ansatz verfolgt: Es wurde erstens angenommen, daß prokaryotisch Mikroorganismen im Ökosystem generell kleiner als 1 µm sind; zweitens, daß sich partikelgebundene Bakterien auf Filtern mit einer Porengröße von 1 µm anreichern lassen, während freilebende Bakterien diesen Filter nahezu ungehindert passieren können sollten. Folglich sollten sich in dem vom Filter zurückgehaltenen Material, im Folgenden als Retentat bezeichnet, bevorzugt partikelgebundene Bakterien anreichern, während sich im gefilterten Seewasser, dem Filtrat, ein hoher Anteil an freilebenden Mikroorganismen finden sollte.

Filtrat, Retentat sowie unbehandelte Wasserproben wurden auf den folgenden vier verschiedenen Nährmedien ausplattiert: auf Marine Broth Agar (MB), auf Nutrient Mineral Salts Agar supplementiert mit Methanol (NMS + MeOH), auf Triple Sugar Iron Agar (TSI) und auf einen modifizierten ZoBell Agar, supplementiert mit Nitrat ( $\frac{1}{2}$  ZB +  $\text{NO}_3^-$ ). Denitrifizierende Bakterien wurden anaerob inkubiert. Die Zusammensetzung der Medien findet sich in Absatz 2.2.1.1. Alle Planierungen wurden in Triplikaten vorgenommen.

Die Wasserproben wurden nach folgendem Schema ausplattiert:

- **Unbehandelte Wasserproben** (gesamte Fraktion): Pro Platte wurden 150 µl unfraktioniertes Meerwasser ausplattiert.
- **Retentat** (partikelgebundene Fraktion): 3 x 50 ml Wasserprobe (Gesamtvolumen 150 ml) wurden in eine sterile 50 ml Luer - Lock Einwegspritze aufgezogen und durch einen autoklavierten, mit einem 1 µm Nucleopore – Filter bestückten Luer - Lock Filteraufsatz gepresst. 50 ml des Filtrates wurden zur Isolierung der freilebenden Bakterien in einem sterilen Falcon – Tube gesammelt. Der Filter mit dem zurückgehaltenen Material (Retentat) wurde in ein steriles 2 ml Eppendorf – Reaktionsgefäß überführt, in welchem sich sterile Glaskugeln mit einem Durchmesser von 2 mm und 3 mm befanden. Zur Resuspension der bakteriellen Biomasse wurde 1 ml steriles Meerwasser in dieses Gefäß gegeben, das Eppendorfgefäß für 30 Sekunden in einem Ultraschallbad beschallt und anschließend für etwa 2 Minuten kräftig gevortext. Die erhaltene Suspension wurde

folgendermaßen ausplattiert: Auf NMS + MeOH Agar wurden 200 µl unverdünnte Suspension ausplattiert; MB – Agar, TSI – Agar und ½ ZB + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Agar wurden mit je 100 µl einer mit autoklaviertem Meerwasser 1:10 verdünnten Suspension beimpft.

- **Filtrat** (freilebende Fraktion): Aus dem steril in Falcon – Tubes aufgefangenen Filtrat wurden je 200 µl auf die vier verschiedenen Nährmedien ausgebracht.

### **2.1.3.2 Fraktionierte Filtration**

Die bakterielle Biomasse aus Aliquots zu je drei bis vier Liter Wasserprobe wurden auf einem Filtrationsgestell unter leichtem Unterdruck auf Polycarbonat – Glasfaser - Filtersandwiches gesammelt, wie unten im Detail beschrieben. Das gesamte Probenvolumen von drei bis vier Liter Seewasser wurde zunächst auf einem Filtersandwich mit einem Polycarbonat – Filter einer Porengröße von 1 µm vorfiltriert. Die auf diesem Filter zurückgehaltene Biomasse repräsentiert überwiegend Organismen aus der partikelgebundenen Fraktion. Das Filtrat wurde anschließend über einen zweiten Filtersandwich abfiltriert. Der Polycarbonat – Filter besaß hier eine Porenweite von 0,2 µm, so daß auf diesem Filter bevorzugt Mikroorganismen einer Größe zwischen etwa 1 µm und etwa 0,2 µm zurückgehalten werden sollten. Die auf diesem Filter zurückgehaltene Lebensgemeinschaft wird im Weiteren als freilebende Fraktion bezeichnet.

#### **2.1.3.2.1 Aufbau des Filtrationsgestelles**

Ein Filtrationsgestell bestand aus einem Filteraufsatz (1 l, Schott, Hofheim # 247209003,), in welchen der auf einer Glassinterplatte (Schott, Hofheim 2520901, Ø 90 mm) aufliegende Filtersandwich eingeschraubt wurde. Der Filteraufsatz wurde auf eine Saugflasche (2 l, Schott, Hofheim) aufgesetzt. Die Saugflasche wurde über einen Schlauch mit einer Waschflasche mit aufgesetztem Barometer und Druckregulationsmöglichkeit verbunden. Die Waschflasche wiederum wurde mit einer Vakuumpumpe verbunden, über die somit in der Saugflasche ein kontrollierter Unterdruck erzeugt werden konnte. Für die Filtration von drei bis vier Liter Seewasser wurde anschließend eine Druckdifferenz von 0,2 bar zum Atmosphärendruck für die Filtration auf 1 µm Polycarbonat – Filter angelegt, während für die Filtration auf 0,2 µm Polycarbonat – Filter eine Druckdifferenz von 0,6 bar erforderlich war.

Der Filtersandwich setzte sich aus zwei Komponenten zusammen: Erstens, aus einem Polycarbonat – Filter einer Porenweite von 1 µm (Nucleopore 601, Ø 90 mm) oder 0,2 µm (Nucleopore 6002, Ø 90 mm) und zweitens aus einem Glasfaserfilter (GF/F) (Whatman 1825090, Ø 90 mm), der vor Benutzung für mindestens drei Stunden bei 450 °C ausgeglüht wurde, um Reste des bei der Herstellung verwendeten Bindemittels zu entfernen.

### **2.1.4 Hintergrundparameter**

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden von anderen Arbeitsgruppen verschiedene Hintergrundparameter bestimmt, die für die Interpretation der Ergebnisse vorliegender Arbeit

nützlich sind. Zu diesen Parametern gehören die Temperatur, die Salinität und die Sauerstoffkonzentration des Wasserkörpers, welche durch kontinuierliche Messungen mit Hilfe des Video – Profilers sowie mit diesem verbundenen Meßgeräten erhoben wurden. Weitere Parameter wurden durch Analyse von Probenmaterial aus den identischen Wasserproben erhoben, auf die sich auch die vorliegende Untersuchung stützt. Dazu gehören die Partikelanzahl und – abmessungen, Gesamtzellzahl (DAPI – Counts), Thymidin – Leucin – Einbau; die Aufnahmeraten für Aminosäure und Glucose, die Nitrit – und Nitratkonzentrationen, die Chlorophyll – und Phaeophytinkonzentrationen sowie die enzymatischen Aktivitäten an Leucin – Aminopeptidase,  $\beta$  - Glucosidase und Chitinase. Eine Darstellung der erhobenen Meßwerte findet sich im Anhang.

## 2.2 Mikrobiologische Techniken

### 2.2.1 Allgemeines

#### 2.2.1.1 Verwendete Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden mit MilliQ - Wasser angesetzt. Der pH - Wert, sofern er sich nicht von selbst ergab, wurde mit 1M NaOH bzw. HCl eingestellt. Für Festmedien (Agar) wurde Difco – Bacto – Agar (Difco, No. 0140-01) mit einer Konzentration von 16 g / l verwendet, mit Ausnahme des NMS – Mediums, bei welchem zur Verfestigung gereinigte Agarose (FMC Seakem LE) eingesetzt wurde, um den Eintrag komplexer Substanzen in das definierte Medium zu minimieren.

*AUX – Medium (gebrauchsfertig von Bio - Mérieux bezogen, Zusammensetzung nach Angaben des Herstellers)*

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2,0 g/l
Agar.....	1,5 g/l
anorganische Salze .....	82,8 mg/l
Aminosäuren .....	250,0 mg/l
Vitamine und Nährsubstrate .....	35,9 mg/l
Phosphatpuffer 0,04 M, pH 7,1 ....	ad 1000 ml
pH 7,2	

*EM – Medium (Edward R. B. Moores Medium)*

Bacto-Tryptone (Difco 0123-17-3) .....	20 g/l
Hefeextrakt (Merck 3753).....	5 g/l
Glucose.....	5 g/l
NaCl .....	5 g/l
pH.....	7,2 bei 25 °C



*MB - Medium (Difco Marine Broth 2216)*

Pepton.....	5,0 g/l
Hefeextrakt .....	1,0 g/l
NaCl .....	19,45 g/l
MgCl <sub>2</sub> .....	8,8 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	3,24 g/l
CaCl <sub>2</sub> .....	1,8 g/l
KCl .....	0,55 g/l
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,16 g/l
Eisencitrat .....	0,1 g/l
KBr .....	0,08 g/l
SrCl <sub>2</sub> .....	0,03 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,02 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	8,0 mg/l
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .....	4,0 mg/l
NaF .....	2,4 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	1,6 mg/l
pH.....	7,6 bei 25 °C

*Modifiziertes MB-Medium (MB ½)*

(halbkonzentriertes MB-Medium, ggf. supplementiert mit 0,2 % Methanol)

*1/10 MB-Medium mit Methanol*

(1/10 konzentriertes MB-Medium, supplementiert mit 30 g/l Meersalz und 0,2 % Methanol)

*NB - Medium (Difco 0003-17-8)*

Pepton.....	8,0 g/l
Fleischextrakt .....	3,0 g/l
pH.....	7,0 bei 25 °C

*NB-Medium + KNO<sub>3</sub>*

Pepton.....	8,0 g/l
Fleischextrakt .....	3,0 g/l
KNO <sub>3</sub> .....	10,0 g/l
pH.....	7,0 bei 25 °C

*Leifson modified O-F (MOF) Medium, modifiziert nach (Smibert & Krieg, 1981), (Leifson, 1963)*

Casitone (Difco 0259-01) .....	1,0 g
Hefeextrakt (Difco 0127-17-9).....	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Tris Base.....	0,5 g
Phenol – Rot .....	0,01 g
Agar .....	3,0 g
Sea Salts (artificial, Sigma S-9883).....	30 g/l
MilliQ Wasser .....	ad 1000 ml

*Nitrate Mineral Salts Medium (NMS), supplementiert mit Methanol*

NaCl .....	35 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O .....	1,0 g/l
KNO <sub>3</sub> .....	1,0 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O .....	0,356 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,272 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O .....	0,20 g/l
Eisen Ammonium EDTA .....	4,0 mg
pH .....	6,8 bei 25 °C
nach dem Autoklavieren zugeben:	
Methanol .....	0,2 % [v/v]
Spurenelementelsg. (1000x) .....	1,0 ml
Vitaminlösung (1000x) .....	1,0 ml

*Modifiziertes R2A - Medium nach Reasoner und Geldreich (1985) (Reasoner & Geldreich, 1985) (Difco 1826-17-1)*

Difco Casamino Acids .....	0,5 g/l
Glucose .....	0,5 g/l
Hefeextrakt .....	0,5 g/l
Proteose - Pepton .....	0,5 g/l
Stärke, lösl. ....	0,5 g/l
Natriumpyruvat .....	0,3 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,05 g/l
pH .....	7,2 bei 25 °C,
eingestellt mit 0,1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> oder 0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

*Spurenelementelösung (1000x)*

Di – Natrium EDTA .....	0,5 g /l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O .....	0,2 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,030 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O .....	0,020 g/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O .....	0,010 g/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O .....	3,0 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	3,0 mg/l
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O .....	2,0 mg/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	1,0 mg/l
sterilfiltriert	

*TSI - Medium (Difco Triple Sugar Iron Agar, No. 0265-17-1)*

Pepton .....	20,0 g/l
Lactose .....	10,0 g/l
Saccharose .....	10,0 g/l
Proteose - Pepton .....	5,0 g/l
Fleischextrakt .....	3,0 g/l
Hefeextrakt .....	3,0 g/l
Glucose .....	1,0 g/l
NaCl .....	5,0 g/l
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	0,3 g/l
Eisencitrat .....	0,3 g/l
Phenolrot .....	0,025 g/l
pH .....	7,4 bei 25 °C

*Vitaminlösung (1000x)*

Biotin .....	20 µg/l
Folsäure .....	20 µg/l
Thiamin – HCl .....	50 µg/l
Calcium – Panthothenat .....	50 µg/l
Vitamin B12 .....	1 µg/l
Riboflavin .....	50 µg/l
Nicotinamid .....	50 µg/l
sterilfiltriert	

*Modifiziertes ZoBell - Medium (ZB, modifiziert nach Oppenheimer und ZoBell 1956) (ZoBell, 1952)*

Difco Marine Broth 2216 .....	9,35 g/l
Pepton .....	3,75 g/l
Hefeextrakt .....	0,75 g/l
pH .....	7,6 bei 25 °C

**2.2.1.2 Verwendete Bakterienstämme**

Die folgenden Bakterienstämme wurden als Referenzstämme bei den Untersuchungen eingesetzt:

<u>Spezies .....</u>	<u>Stamm Nr. ....</u>	<u>Verwendung .....</u>
Acinetobacter calcoaceticus .....	DSM 30006 T .....	LMW - RNA
Acinetobacter johnsonii .....	DSM 6963 T .....	LMW - RNA
Acinetobacter lwoffii .....	DSM 2403 T .....	LMW - RNA
Acinetobacter radioresistens .....	DSM 6976 T .....	LMW - RNA
Aeromonas hydrophila ssp. proteolytica .....	ATCC 15338 T .....	LMW - RNA
Agrobacterium tumefaciens .....	DSM 30205 T .....	SSCP
Alteromonas macleodii .....	ATCC 27126 T .....	LMW - RNA
Arthrobacter globiformis .....	DSM 20124 T .....	EXT - KAL
Bacillus licheniformis .....	DSM 13 T .....	SSCP
Brevundimonas aurantiaca .....	DSM 4731 T .....	LMW - RNA
Brevundimonas diminuta .....	LMG 2337 .....	LMW - RNA
Brevundimonas diminuta .....	LMG 2089 T .....	LMW - RNA
Brevundimonas intermedia .....	ATCC 15262 T .....	LMW - RNA
Brevundimonas sp. ....	LMG 9564 .....	LMW - RNA, 16S - SEQ
Brevundimonas sp. ....	LMG 11070 .....	LMW - RNA, 16S - SEQ
Brevundimonas sp. ....	LMG 9567t1 .....	LMW - RNA, 16S - SEQ
Brevundimonas vesicularis .....	LMG 11141 .....	LMW - RNA
Brevundimonas vesicularis .....	LMG 2350 T .....	LMW - RNA
Brevundimonas - like sp. ....	LMG 11050 .....	LMW - RNA, 16S - SEQ
Caulobacter halobacteroides .....	ATCC 15269 T .....	LMW - RNA
Caulobacter henricii .....	ATCC 15253 T .....	LMW - RNA
Caulobacter segnis .....	DSM 7131 T .....	LMW - RNA
Caulobacter vibrioides .....	DSM 9893 T .....	LMW - RNA
Erythrobacter longus .....	ATCC 33941 T .....	LMW - RNA
Escherichia coli .....	DSM 613 .....	EXT - KAL
Flavobacterium johnsoniae .....	DSM 2064 T .....	EXT - KAL, SSCP
Halomonas aquamarina .....	DSM 30161 T .....	LMW - RNA
Halomonas euryhalina .....	ATCC 49336 T .....	LMW - RNA
Halomonas marina .....	ATCC 25374 T .....	LMW - RNA
Listonella pelagia .....	ATCC 25916 T .....	LMW - RNA
Maricaulis maris .....	ATCC 15268 T .....	LMW - RNA
Marinomonas communis .....	ATCC 27118 T .....	LMW - RNA
Marinomonas vaga .....	ATCC 27119 T .....	LMW - RNA
Methylococcus capsulatus .....	ATCC 19069 T .....	LMW - RNA
Methylophaga marina .....	DSM 5689 T .....	LMW - RNA
Methylophaga sulfidovorans .....	LMG 95210 T .....	LMW - RNA
Methylophaga thalassica .....	DSM 5690 T .....	LMW - RNA
[Mycoplana] bullata .....	DSM 7126 T .....	LMW - RNA
Mycoplana dimorpha .....	DSM 7138 T .....	LMW - RNA
Mycoplana ramosa .....	DSM 7292 T .....	LMW - RNA
Photobacterium phosphoreum .....	Str. 313020 R. Christen .....	LMW - RNA

<b>Spezies</b>	<b>Stamm Nr.</b>	<b>Verwendung</b>
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Str. 318988 R. Christen	LMW - RNA
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14029 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas aurantia</i>	ATCC 33046 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas citraea</i>	ATCC 29719 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	ATCC 43337 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	ATCC 14393 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	ATCC 19648	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	ATCC 33492 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas nigrificans</i>	LMG 2227 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	ATCC 29570 T	LMW - RNA
<i>Pseudoalteromonas undina</i>	LMG 2880 T	LMW - RNA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090 T	LMW - RNA
<i>Pseudomonas synxantha</i>	LMG 2335 T	LMW - RNA
<i>Psychrobacter immobilis</i>	ATCC 43116 T	LMW - RNA
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	DSM 7000 T	LMW - RNA
<i>Ralstonia eutropha</i>	DSM 531 T	EXT - KAL
<i>Rhizobium trifolii</i>	DSM 30141 T	SSCP
<i>Roseobacter denitrificans</i>	ATCC 43942 T	LMW - RNA
<i>Salinivibrio costicola</i>	ATCC 33508 T	LMW - RNA
<i>Shewanella putrefaciens</i>	ATCC 8072	LMW - RNA
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	JCM 7509	LMW - RNA
<i>Sphingomonas subarctica</i>	DSM 10700 T	LMW - RNA
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	CCUG 28380	LMW - RNA
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	JCM 7371 T	LMW - RNA
<i>Vibrio adaptatus</i>	ATCC 19263 T	LMW - RNA
<i>Vibrio aestuarius</i>	CIP 102971 T	LMW - RNA
<i>Vibrio albensis</i>	ATCC 14542 T	LMW - RNA
<i>Vibrio alginolyticus</i>	DSM 2171 T	LMW - RNA
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 14390 T	LMW - RNA
<i>Vibrio anguillarum</i>	ATCC 19264 T	LMW - RNA
<i>Vibrio carchariae</i>	ATCC 35084 T	LMW - RNA
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 14033	LMW - RNA
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	ATCC 35912 T	LMW - RNA
<i>Vibrio damsela</i> ssp. <i>damsela</i>	CIP 102761 T	LMW - RNA
<i>Vibrio damsela</i> ssp. <i>pisciscida</i>	CIP 104404 T	LMW - RNA
<i>Vibrio fischeri</i>	DSM 2168	LMW - RNA
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33809 T	LMW - RNA
<i>Vibrio furnisii</i>	ATCC 35016 T	LMW - RNA
<i>Vibrio gazogenes</i>	ATCC 29998 T	LMW - RNA
<i>Vibrio harveyi</i>	DSM 2165	LMW - RNA
<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 T	LMW - RNA
<i>Vibrio harveyi</i>	DSM 2332	LMW - RNA
<i>Vibrio logei</i>	ATCC 15382 T	LMW - RNA
<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203 T	LMW - RNA
<i>Vibrio metschnikovii</i>	Str. Mericux R. Christen	LMW - RNA
<i>Vibrio mimicus</i>	LMD 8130	LMW - RNA
<i>Vibrio mimicus</i>	ATCC 33653 T	LMW - RNA
<i>Vibrio navarrensis</i>	CIP 103381 T	LMW - RNA
<i>Vibrio nigrapulchritudo</i>	ATCC 27043 T	LMW - RNA
<i>Vibrio ordalii</i>	ATCC 33509 T	LMW - RNA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CIP 73.30	LMW - RNA
<i>Vibrio salmonicida</i>	NCMB 2262 T	LMW - RNA
<i>Vibrio</i> sp.	NCIMB 2272	LMW - RNA
<i>Vibrio vulnificus</i>	DSM 10143 T	LMW - RNA

Tabelle 1: Bakterienstämme, die in dieser Untersuchung als Referenzstämme oder zur Kalibrierung der Methoden eingesetzt wurden. Abkürzungen: T hinter der Stammnummer: Typ – Stamm der Spezies; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA; CCUG, Culture Collection University of Göteborg, Schweden; CIP, Collection of the Institut Pasteur, Paris, Frankreich; DSM, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Deutschland; JCM, Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan; LMD, Laboratory of Microbiology, University Delft, Niederlande; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien; NCIMB, National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Schottland; NCMB, National Collection of Marine Bacteria, Aberdeen, Schottland; Str. R. Christen, Stämme von Dr. R. Christen, Villefrance s. M., Frankreich; LMW – RNA, Referenzstamm zur RNA – Profil – Analyse; 16S – Seq, Referenzstamm zur Sequenzierung des 16S rRNA – Genes; EXT – KAL, eingesetzt zur Kalibrierung der kombinierten DNA – RNA Extraktion (siehe 2.3.2.1); SSCP, eingesetzt als einzelsträngiger DNA - Standard zur Normalisierung des Laufverhaltens verschiedener SSCP Gele. Die Nomenklatur entspricht dem Stand von Januar 1999.

## 2.2.2 Bestimmung der Colony Forming Units

Colony forming units (CFU) wurden von den Agarplatten bestimmt, die wie in Abschnitt 2.1.3.1 dargestellt, beimpft wurden. Hierzu wurden die Platten nach 14 tägiger Inkubation bei 20 °C ausgezählt und aus den erhaltenen Kolonienzahlen durch Multiplikation mit einem Verdünnungsfaktor die Anzahl der CFUs pro ml Wasserprobe berechnet. Der Verdünnungsfaktor ergab sich wie in Tabelle 2 dargestellt:

<i>Fraktion</i>	<i>Eingesetzte Wasserproben – Menge (oder Äquivalent) pro Platte</i>	<i>Verdünnung (entspricht Probenvolumen / 1 ml Wasserprobe)</i>	<i>Verdünnungsfaktor (= 1 / Verdünnung)</i>
Gesamt	150 µl	0,15	6,67
Filtrat	200 µl	0,2	5
Retentat (MB, TSI, ½ ZB + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	100 µl einer 1:10 verd. Suspension (Ausgangskonzentration 150 - fach)	1,5	0,67
Retentat (NMS + MeOH)	200 µl unverd. Susp.	30	0,03

Tabelle 2: Bestimmung des Verdünnungsfaktors zur Berechnung der CFUs / ml

## 2.2.3 Kultur von Mikroorganismen

### 2.2.3.1 Isolierung von Mikroorganismen

Mikroorganismen wurden in einem Zeitraum zwischen zwei und zwölf Monaten nach Ausplattieren der Wasserproben isoliert. Es wurden ausschließlich Isolate von MB - und von NMS + MeOH – Agarplatten für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dabei repräsentierten die von MB – Platten gewonnenen Isolate die heterotrophen, saprophytischen Organismen, während auf NMS + MeOH Platten methylo trope Organismen, involviert in den Metabolismus von Oxidationsprodukten methanoxidierender Bakterien (Methanol, Formaldehyd, Ameisensäure), angereichert werden sollten. Die Isolation methanoxidierender Bakterien wurde nicht erwartet, denn sie können ohne Adaptionsphase, d.h. bei gleichzeitiger Anwesenheit von Methanol und Methan, auf methanolhaltigen Medien nicht wachsen, siehe hierzu auch (Lidstrom, 1991).

Isolate von MB – Platten wurden durch mindestens dreimaligen Ausstrich und Weiterführung ausgehend von jeweils einer einzelstehenden Kolonie gereinigt. Isolate von NMS + MeOH Agarplatten wurden abwechselnd auf NMS + MeOH und 1/10 MB + MeOH Agar (um ggf. Kontaminanten das Heranwachsen zu ermöglichen) ausgestrichen. Das Ausstreichen wurde so lange wiederholt, bis die Isolate makroskopisch einheitliche Kolonien bildeten.

### **2.2.3.2 Gewinnung von Biomasse**

Dieser Abschnitt bezieht sich auf die Gewinnung der Biomasse von Isolaten und Referenzstämmen. Die Ernte von Biomasse aus Umweltproben wurde in Abschnitt 2.1.3.2 dargestellt.

Heterotrophe Mikroorganismen wurden für die Gewinnung von Biomasse zur Analyse durch Low – Molecular – Weight – RNA - Profile und Sequenzierung des 16S rRNA – Gens auf MB – Agarplatten angezogen, methylorophe Organismen wurden auf MB – Platten, supplementiert mit 0,2 % [v/v] Methanol kultiviert. Referenzstämmen wurden gemäß den Empfehlungen der Bezugsquelle herangezogen; in der Regel jedoch wurden zur Gewinnung von Biomasse marine Stämme auf MB – Agar, Stämme nicht mariner Herkunft auf NB -, EM – oder R2A – Agar ausplattiert. Beimpfte Agarplatten wurden bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und täglich auf Wachstum sowie auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Die Zellernte fand während der mittleren logarithmischen Phase statt, welche stammspezifisch in einem Zeitraum zwischen zwölf Stunden bis sieben Tagen erreicht wurde.

Zu erntende Agarplatten wurden mit 1 ml eines 0,1 M [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ] – Puffers gespült. Anschließend wurde die Biomasse mit einem sauberen, in 70 % [v/v] Ethanol gespülten und abgeflamten Metallspatel von der Agarplatte abgehoben und mit einer sterilen Eppendorf – Pipette in ein Eppendorf – Reaktionsgefäß (Volumen: 2ml) überführt. Die Bakteriensuspension wurde dann durch Zentrifugation (15000x g, 4° C, 10 min) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei –20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Biomasse von Referenzstämmen, die in einer bestimmten Zellkonzentration geerntet werden sollten, wurden geerntet, indem Zellkulturen in Flüssigmedien mit Hilfe eines sterilen Magnetrührkerns auf einem Magnetrührer homogenisiert wurden, aus den homogenen Suspensionen die OD<sub>595</sub> nm durch spektrophotometrische Vermessung bestimmt wurde, ein Aliquot mit 2 % Formaldehyd zur Zellzahlbestimmung durch mikroskopische Auszählung fixiert wurde und schließlich den Suspensionen ein entsprechendes Aliquot entnommen wurde. Die Biomasse wurde auf Polycarbonat (Ø 0,2 µm) – GFF – Filtersandwiches geerntet, wie unter 2.1.3.2 beschrieben.

### **2.2.3.3 Konservierung der Isolate**

Zur Konservierung der Isolate und der Referenzstämmen wurden Glycerolstocks angelegt. Hierzu wurden die betreffenden Stämme angezogen und geerntet, wie in 2.2.3.2 beschrieben und in sterilen Kryo - Gefäßen mit sterilem Glycerol in einer Endkonzentration von 10 % [v/v] vermischt. Die Glycerole wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Ausbildung von Eiskristallen zu minimieren und dann bei –70°C gelagert.

### **2.2.3.4 Physiologische Tests**

Ausgewählte Isolate wurden verschiedenen physiologischen Tests unterzogen. Die getesteten Parameter umfaßten Temperaturanspruch, Salztoleranz, Substratverwertung und enzymatische Abbauleistung.

#### **2.2.3.4.1 Temperaturanspruch**

Der Temperaturanspruch wurde getestet, indem marine Isolate auf MB – Festmedien ausgestrichen und bei Temperaturen von 4° C, 15 °C, 22 °C (Raumtemperatur), 30 °C, 37 °C und 42 °C inkubiert wurden.

#### **2.2.3.4.2 Salztoleranz**

Die Salztoleranz wurde bestimmt, indem Isolate auf NB – Agar, supplementiert mit NaCl in Konzentrationen von [w/v]: 0 %, 1 %, 3 %, 6 % und 12 % herangezogen wurden.

#### **2.2.3.4.3 Substratverwertungstests**

Substratverwertungstests wurden mit API – Teststreifen API 20 NE (siehe (Lampe & Van der Reijden, 1984), (Geiss, Piotrowski & Hingst, 1985), (Von Graevenitz & Zollinger-Iten, 1985)) API 50 CH (Schmidt, 1980) und API Biotype 100 (Bio-Merieux, Nürtingen, No. 25200; 50 300; 88 818) und mit BIOLOG – Microplate Mikrotiterplatten (BioLog Inc., USA) (siehe (Klingler *et al.*, 1992), (Miller & D.L., 1991), (Rüger & Krambeck, 1994), (Stager & Davis, 1992)) durchgeführt.

##### **2.2.3.4.3.1 API - Teststreifen**

Für die Substratverwertung mit API – Teststreifen wurden Isolate auf MB – Agar je nach Wachstumsgeschwindigkeit zwischen zwei und fünf Tagen bei Raumtemperatur herangezogen, mit einem sterilen Wattetupfer vom Festmedium abgenommen und in 3,5 % [w/v] Saline resuspendiert und durch Vortexen homogenisiert. Die OD<sub>595</sub> der Suspension betrug ca. 0,80. Mit einer sterilen Eppendorf – Pipettenspitze wurde 1 ml Suspension entnommen und in einer Ampulle AUX – Medium (auxotrophes Medium, ohne Kohlenstoffquelle; Bio-Merieux, Nürtingen) suspendiert. Mit dieser Suspension wurden die Mikroröhrchen der Teststreifen gemäß den Empfehlungen des Herstellers gefüllt. Die Teststreifen wurden bei 30 °C inkubiert und nach 24 Std., 48 Std. und 72 Std. auf Wachstum bzw. Farbumschlag kontrolliert. Vorhandensein einer Trübung durch Wachstum bzw. eines charakteristischen Farbumschlages im Mikroröhrchen am Ende der Inkubationsperiode wurde als positiv, keine Trübung bzw. kein oder ein falscher Farbumschlag als negativ gewertet.

### **2.2.3.4.3.2 BIOLOG**

Die Substratverwertung mit BIOLOG - GN - Mikrotiterplatten, in deren Kavitäten 95 Substrate in dehydrierter Form vorliegen, wurde folgendermaßen durchgeführt: Isolate wurden auf MB – Agar je nach Wachstumsgeschwindigkeit zwischen zwei und fünf Tagen bei Raumtemperatur herangezogen, mit einem sterilen Wattetupfer vom Festmedium abgenommen und in 3,5 % [w/v] Saline resuspendiert und durch Vortexen homogenisiert. Die OD<sub>595</sub> der Suspension wurde auf 0,30 bis 0,35 eingestellt. Jede Kavität der Mikrotiterplatte wurde nun mit 150 µl Suspension beimpft und bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) für sieben Tage inkubiert. Die Substratoxidation konnte durch den Farbumschlag eines farblosen Tetrazoliumsalzes, das durch Reduktion in ein rotgefärbtes Formazan überführt wird, gemessen werden. Das Ablesen der Mikrotiterplatten erfolgte visuell und durch Messung der Extinktion bei 595 nm mit einem ELISA – Reader (Emax precision microplate reader) nach 24 Std., 48 Std., 72 Std. und sieben Tagen. Eine deutliche Oxidation des Substrates, gemessen durch die Reduktion des Tetrazoliumsalzes (wobei OD<sub>595</sub> > 0,5 nach Abzug des Nullwertes), wurde als positiv, eine schwache oder keine Substratoxidation (OD<sub>595</sub> > 0,5) wurde als negativ gewertet.

### **2.2.3.4.3.3 Auswertung der Substratverwertungstests**

Der Vergleich der Substratverwertung fand folgendermassen statt: Die Ergebnisse aus API – Teststreifen und aus dem Biolog – Test wurden in einer Tabelle nach Kohlenstoffquellen sortiert und zusammengefaßt, wenn die Ergebnisse sowohl bei den API – Tests (Substratverwertung) als auch bei dem BIOLOG - Test (Substratoxidation) identisch waren (was, von vereinzelt Ausnahmen mit schwach positivem BIOLOG – aber negativem API - Test abgesehen, auch tatsächlich der Fall war). Ansonsten wurde das Ergebnis aus dem BIOLOG – Test nicht berücksichtigt, erstens, da der Nachweis einer Substratoxidation nicht zwingend impliziert, daß der Testorganismus aus dieser Reaktion tatsächlich nutzbare Stoffwechselenergie gewinnen kann und zweitens, weil die weitere Auswertung durch Mehrfachwertung einer Kohlenstoffquelle stärker verzerrt worden wäre als durch Auslassen der betreffenden Meßreihe. Die Zusammenfassung der Meßwerte aller Kohlenstoffquellen je Isolat, im Folgenden als metabolisches Profil bezeichnet, wurde in eine binäre Matrix übersetzt, indem positive Reaktionen als 1 und negative Reaktionen als 0 gesetzt wurden. Durch Vergleich der Ähnlichkeiten der binären Matrices wurde eine Ähnlichkeitsmatrix erstellt. Die Ähnlichkeitsmatrix wurde mit zwei verschiedenen Algorithmen einer Clusteranalyse unterzogen, mit dem Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) - und dem Complete Linkage (CL) Algorithmus.



In Tabelle 3 findet sich eine Auflistung aller getesteten Kohlenstoffquellen.

Acetat (S)	Glucose-1-Phosphat (S)	L-Ornithin (S)
trans-Aconitat (W)	Glucose-6-Phosphat (S)	Palatinose (W)
Adipat (W)	1-0-Methyl- $\alpha$ -D-Glucopyranosid (W)	Phenylethylamin (S)
Adonitol (W,S)	1-0-Methyl- $\beta$ -Glucopyranosid (W)	Phenylacetat (W)
D-Alanin (W,S)	3-0-Methyl-D-Glucopyranosid (W)	L-phenylalanin (S)
L-Alanin (W,S)	Glucuronamid (S)	3-Phenylpropionat (W)
Alaninamid (S)	D-Glucuronat (W,S)	L-Prolin (W,S)
L-Alanyl-Glycin (S)	L-Glutamat (W,S)	Propionat (W,S)
Amidon (W)	Glutarat (W)	Protocatechuat (W)
Amygdalin (W)	DL-Glycerat (W)	D-Psicose (S)
D-Arabinose (W)	Glycerol (W,S)	Methylpyruvat (S)
L-Arabinose (W,S)	D,L- $\alpha$ -Glycerolphosphat (S)	Putrescin (W,S)
D-Arabitol (W,S)	Glycogen (W,S)	L-Pyroglyutamat (S)
L-Arabitol (W)	Glycyl-L-Aspartat (S)	(-)-Quinat (W,S)
Arbutin (W)	Glycyl-L-Glutamat (S)	D-Raffinose (W,S)
L-Asparagin (S)	Histamin (W)	$\alpha$ -L-Rhamnose (W,S)
L-Aspartat (W,S)	L-Histidin (W,S)	D(-)-Ribose (W)
Benzoat (W)	m-Hydroxybenzoat (=3-Hydroxybenzoat) (W)	D-Saccharat (W,S)
Betain (W)	p-Hydroxybenzoat (=4-Hydroxybenzoat) (W)	Saccharose (= Sucrose) (W,S)
2,3-Butandiol (S)	$\alpha$ -Hydroxybutyrat (W)	Salicin (W)
DL- $\alpha$ -Amino-n-Butyrat (=4-Aminobutyrat) (W)	$\beta$ -Hydroxybutyrat (W,S)	Sebacat (S)
$\gamma$ -Aminobutyrat (S)	$\gamma$ -Hydroxybutyrat (S)	L-Serin (W,S)
Caprat (W)	Hydroxy-L-Prolin (S)	D-Serin (S)
Caprylat (W)	p-Hydroxyphenylacetat (S)	D-Sorbitol (W,S)
D,L-Carnitin (S)	Inosin (S)	L-Sorbose (W)
Cellobiose (W,S)	myo-Inositol (W,S)	Succinaminsäure (S)
cis-Aconitat (W,S)	Inulin (W)	Succinat (S)
Citrat (W,S)	Itaconat (W,S)	Brom-Succinat (S)
m-Cumarat (W)	$\alpha$ -Ketobutyrat (S)	Mono-Methylsuccinat (S)
$\alpha$ -Cyclodextrin (S)	$\alpha$ -Ketoglutarat (S)	D-Tagatose (W)
Dextrin (S)	$\alpha$ -Ketovaleriat (S)	D(-)-Tartrat (W)
Dulcitol (W)	2-Keto-D-Gluconat (W)	L(+)-Tartrat (W)
2-Aminoethanol (S)	5-Keto-D-Gluconat (W)	meso-Tartrat (W)
i-Erythriol (W,S)	$\alpha$ -Ketoglutarat (=2-Ketoglutarat, 2-Oxoglutarat) (W)	L-Threonin (S)
Formiat (S)	DL-Lactat (W,S)	Thymidin (S)
Ethanolamin (W)	Lactose (W,S)	Trehalose (W,S)
D-Fructose (W,S)	Lactulose (W,S)	Tricarballoylat (W)
D-Fucose (W)	L-Leucine (S)	Trigonellin (W)
L-Fucose (W,S)	D-Lyxose (W)	Tryptamin (W)
Fumarat (W)	D(+)-Malat (W)	Turanose (W,S)
N-Acetyl-D-Galactosamin (S)	L(-)-Malat (W)	tween 40 (S)
D-Galactonsäure Lacton (S)	Malonat (W,S)	tween 80 (S)
1-0-Methyl- $\alpha$ -Galactopyranosid (W)	Maltitol (W)	L-Tyrosin (W)
1-0-Methyl- $\beta$ -Galactopyranosid (W)	Maltose (W,S)	Uridin (S)
D-Galactose (W,S)	Maltotriose (W)	Urocansäure (S)
D-Galacturonat (W,S)	Mannitol (W,S)	DL- $\alpha$ -Amino-n-Valerat (=5-Aminovalerat) (W)
Gentiobiose (W,S)	Mannose D- (W,S)	Xylitol (W,S)
Gentisat (W)	$\alpha$ -Methyl-D-Mannosid (W)	D-Xylose (W)
Gluconat (W,S)	Melezitose (W)	L-Xylose (W)
D-Glucosamin (W,S)	Melibiose (W,S)	$\beta$ -Methyl-Xylosid (W)
N-Acetyl-D-Glucosamin (W,S)	Mucat (W)	
D-Glucosaminsäure (S)		
$\alpha$ -D-Glucose (W,S)		

Tabelle 3: Alphabetische Liste der getesteten Kohlenstoffquellen zur Charakterisierung des Substratspektrums ausgewählter Isolate. Abkürzungen: (W) – Wachstumstest (API - Teststreifen); (S) Substratoxidationstest (BIOLOG – Mikrotiterplatten); (W,S) Test auf Wachstum und Substratoxidation durchgeführt.

## 2.2.3.4.4 Enzymatisches Screening

### 2.2.3.4.4.1 Katalase und Oxidase

Die zu testenden Stämme wurden zum Test auf Katalase und Oxidase auf MB – Agar angezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase getestet. Zum Test auf Katalase wurden Kolonien der Teststämme mit einer wässrigen 3 % [v/v] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Lösung beträufelt und auf das Auftreten von Gasblasen geachtet. Trat eine Gasblasenbildung sofort, spätestens aber 5 Minuten nach dem Beträufeln auf, wurde der Katalase – Test als positiv, anderenfalls als negativ gewertet. Der Test auf Oxidase wurde durchgeführt, indem Kolonien des Teststammes mit einer Impföse auf Filterpapier (Whatman) ausgestrichen wurden und das Filterpapier mit einer 1 % Tetramethyl-p-Phenylendiamin Hydrochlorid - Lösung (Bio-Merieux, Nürtingen) beträufelt wurde. Der Test wurde als positiv gewertet, wenn sich spätestens nach 10 Sekunden ein Farbumschlag von farblos nach blau bzw. violett ereignete, ansonsten als negativ.

### 2.2.3.4.4.2 API ZYM Test

Um einen schnellen Einblick über die enzymatische Ausstattung der zu testenden Organismen zu bekommen, wurde ein enzymatisches Screening mit API ZYM Teststreifen durchgeführt. Einzelheiten über die Methode sind (Humble, King & Phillips, 1977) und (Monget, 1978) zu entnehmen. Die Methode wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die mit API ZYM – Streifen getesteten Enzymaktivitäten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

<b>Enzym – Assay</b>	<b>Substrat</b>
Alkalische Phosphatase	2-Naphtyl-Phosphat
Esterase (C 4)	2-Naphtyl-Butyrat
Esterase - Lipase (C 8)	2-Naphtyl-Caprylat
Lipase (C 14)	2-Naphtyl-Myristat
Leucin-Arylamidase	L-Leucyl-2-Naphtylamid
Valin-Arylamidase	L-Valyl-2-Naphtylamid
Cystin-Arylamidase	L-Cystyl-2-Naphtylamid
Trypsin	N-Benzoyl-DL-Arginin-2-Naphtylamid
Chymotrypsin	N-Glutaryl-Phenylalanin-2-Naphtylamid
Saure Phosphatase	2-Naphtyl-Phosphat
Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-Phosphat
$\alpha$ -Galactosidase	6-Br-2-Naphtyl- $\alpha$ D-Galactopyranosid
$\beta$ -Galactosidase	2-Naphtyl- $\beta$ D-Galactopyranosid
$\beta$ -Glucuronidase	Naphtol-AS-BI- $\beta$ D-Glucuronid
$\alpha$ -Glucosidase	2-Naphtyl- $\alpha$ D-Glucopyranosid
$\beta$ -Glucosidase	6-Br-2-Naphtyl- $\beta$ D-Glucopyranosid
N-Acetyl-Glucosaminidase	1-Naphtyl-N-Acetyl- $\beta$ D-Glucosaminid
$\alpha$ -Mannosidase	6-Br-2-Naphtyl- $\alpha$ D-Mannopyranosid
$\alpha$ -Fucosidase	2-Naphtyl- $\alpha$ L-Fucopyranosid

Tabelle 4: API ZYM Enzym – Assays und Substrate der jeweiligen Essays.

### 2.2.3.4.4.3 Andere erfaßte Enzymaktivitäten

Folgende Enzymaktivitäten wurden durch weitere Substratverwertungstests auf den Teststreifen API 20 NE, API 50 CH und API Biotype 100 erfaßt:

<u>Enzym - Assay .....</u>	<u>Substrat</u>
Nitratreduktion $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ .....	Kaliumnitrat
Nitratreduktion $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ .....	Kaliumnitrat
Urease .....	Harnstoff
Arginin-Dihydrolase .....	Arginin
$\beta$ -Glucosidase .....	Esculin
Protease .....	Gelatine
$\beta$ -Galactosidase .....	p-Nitrophenyl- $\beta$ D-Galactopyranosid
$\beta$ -Glucuronidase .....	Hydroxyquinolin- $\beta$ -Glucuronid
Indolbildung .....	Tryptophan
Katalase .....	$\text{H}_2\text{O}_2$
Oxidase .....	Tetramethyl-p-Phenylen-Diamin

Tabelle 5: Enzymaktivitäten, die durch Assays auf API - Teststreifen erfaßt wurden

Die Enzym – Assays wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe Absatz 2.2.3.4.3).

## 2.3 Molekularbiologische Techniken

### 2.3.1 Analyse der Isolate

#### 2.3.1.1 Low-molecular-weight RNA Profile

##### 2.3.1.1.1 Extraktion von RNA aus Isolaten

##### 2.3.1.1.1.1 RNA - Extraktion

Zur Analyse der niedermolekularen RNA (Low - molecular - weight RNA, LMW - RNA) wurden die zellulären Ribonucleinsäuren (RNA) isoliert, wie in (Höfle, 1998), (Höfle, 1988) beschrieben. Der Anteil an zellulären Desoxyribonucleinsäuren (DNA), die in RNA – Präparationen nach diesem Protokoll zurückgehalten wurden, war so gering, daß sich mit einer PCR mit Primern, spezifisch für das 16S rRNA Gen, kein Amplifikationsprodukt nachweisen ließ.

## Lösungen

### Puffer 1

Na - Acetat.....	50 mM
EDTA .....	10 mM

*RNA Extraktions – Mix*

Na – Laurylsarcosin (SLS) ..... 0,5 %  
gelöst in Puffer 1

*Puffer – gesättigtes Phenol*

Phenol.....400 ml  
8-Hydroxychinolin .....400 mg

mit 400 ml Puffer 1 mischen, eine Stunde rühren, Phasentrennung abwarten, Puffer abheben und verwerfen, dann 400 ml neuen Puffer zugeben. Diese Prozedur insgesamt drei Mal durchführen.

*Phenol – Chloroform (4:1)*

Puffer - ges. Phenol .....24 ml  
Chloroform p.A. ....6 ml

*Fällungsmix*

Ethanol p.A.....100 ml  
Na – Acetat Lsg. 2 M ..... 10 ml  
MgCl<sub>2</sub> Lsg. 1 M.....1 ml

*RNA – Puffer*

Trizma Base..... 40 mM  
EDTA ..... 1 mM  
pH 5,0

**Durchführung**

Biomassen der Isolate wurden aufgetaut, mit 0,6 ml Extraktionspuffers vermischt und durch wiederholtes Einsaugen in eine Pipettenspitze suspendiert. Zur Suspension wurden 0,8 ml Puffer B1 – gesättigtes, auf 55 °C temperiertes Phenol pH 4,2 zugegeben. Darauf wurden die Proben für 20 sec durch Vortexen homogenisiert und für 6 min bei 60 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben für eine zweiminütige Inkubation auf Eis gelegt. Darauf wurden die Proben erneut für 15 sec auf 60 °C erhitzt und zur Phasentrennung 5 min bei 20000x g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in frische Eppendorfgefäße überführt, mit 0,7 ml der auf 55 °C temperierten Phenol – Chloroform - Mixtur homogenisiert und für 30 s bei 60 °C im Heizblock inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 20000x g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit dem 0,1fachen Volumen einer 2 M Natriumacetat - Lösung und mit 0,7 ml Chloroform versetzt; bis zur Bildung einer Emulsion gevortext; erneut für 5 min bei 20000x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, zum nahezu vollständigen Entfernen des Phenols, nochmals mit 0,75 ml Chloroform versetzt. Der klare Überstand wurde in zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt und mit dem 2,8fachen Volumen einer Fällungsmixtur bei -20 °C über Nacht gefällt.

Ausgefällte RNA wurde durch 20minütige Zentrifugation bei mindestens 19000 x g und 4 °C pelletiert. Proben, die zur Fällung auf verschiedene Gefäße verteilt worden waren, wurden gepoolt. Die gefällte RNA wurde zweimal mit dem einfachen Volumen Ethanol (eiskalt, 70 %) gewaschen, durch Zentrifugation in einem Vakuum - Rotor (Savant, SpeedVac) für 10 min getrocknet und für mindestens 45 min unter leichtem Schütteln in 300 µl frisch

autoklaviertem MilliQ Wasser oder in RNA - Puffer gelöst. Aus diesen 300 µl Lösung wurden 10 µl RNA entnommen und vermessen, wie in Abschnitt 2.3.1.1.2 beschrieben. Zu den restlichen 290 µl wurde das 2,8fachen Volumen Fällungsmix zugegeben, durch vorsichtiges Schütteln gemischt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### **2.3.1.1.2 RNA – Konzentrationsbestimmung durch UV - Spektrometrie**

Die Konzentration der RNA – Extrakte wurde spektrophotometrisch mit einem GenQuant Photometer (Pharmacia) bestimmt. 10 µl des ungereinigten RNA – Rohextraktes (der entspricht RNA – Pellet + 300 µl Puffer 1; siehe Abschnitt 2.3.1.1.1) wurden mit 490 µl Puffer 1 (Abschnitt 2.3.1.1.1) verdünnt und in Quarzküvetten (Hellma, 108.002-QS) bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge vermessen. Aus der erhaltenen  $E_{260}$  wurde die RNA – Konzentration errechnet, indem mit dem Verdünnungsfaktor (50) multipliziert wurde und aus der errechneten Gesamt – Extinktion die Konzentration nach

$E_{260}=1$  entspricht 40 µg RNA / ml

(Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989) ermittelt wurde.

Die Qualität der Rohextrakte kann aus dem Verhältnis der Absorption von 260 zu 280 nm abgeschätzt werden: Der Quotient liegt bei reiner RNA zwischen 1,8 und 2,0. Ein kleinerer Wert deutet auf Verunreinigungen, z.B. durch Proteine, Polysaccharide oder Phenol hin (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **2.3.1.1.2 Elektrophorese der LMW – RNA Profile**

Eine detaillierte Einführung in die Methodik und die technische Durchführung der LMW – RNA Profil – Analyse findet sich bei (Höfle, 1998), (Höfle, 1988). Hier sollen nur die Grundzüge der Technik erörtert werden.

##### **2.3.1.1.2.1 Elektrophoresesystem**

Die Gelelektrophorese wurde in MacroPhor - Elektrophoresekammern (LKB Corp. 2010) mit Trägerplatten (80-1099-43) und Thermostatisierplatten (80-1099-36) der Firma Pharmacia durchgeführt. Die Größe der Gele betrug 55 cm x 17 cm und die Dicke der Polyacrylamid – Schicht (Geldicke, Gelstärke) 0,4 mm. LMW – RNA Profile wurden auf 12 %igen Polyacrylamid – Gelen unter vollständig denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (d.h. 7 M Harnstoff, 60 °C). Es wurden wahlweise Kämme für 20 oder 36 Taschen verwendet (Pharmacia, 80-1099-52, -54).

### 2.3.1.1.2.2 *Behandlung der Glasplatten*

#### Lösungen

##### *Verdünntes Bind - Silane*

Ethanol p.A.....	5 ml
Essigsäure 100 % p.A.....	50 µl
Bind – Silane (Pharmacia, 17-1330-01) ...	50 µl

#### Durchführung

Die Trägerplatte und die Thermostatisierplatte wurden zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und gründlich poliert. Trägerplatte: Um ein Anhaften des Geles an die Trägerplatte zu gewährleisten, wurde die Trägerplatte mit verdünntem Bind - Silane poliert, 10 min getrocknet, erneut poliert, zur Entfernung von überschüssigem Bind - Silane kurz mit Ethanol (70 %) gewaschen und abschließend poliert. Thermostatisierplatte: Die Thermostatisierplatte wurde unter einem Abzug mit 2 ml unverdünntem Repel - Silane (Pharmacia, 17-1331-01) beschichtet, um ein Anhaften der Gele an der Thermostatisierplatte zu verhindern, für 10 min getrocknet, erneut poliert, kurz mit Ethanol (70 %) gewaschen und abschließend poliert. Die Beschichtung der Thermostatisierplatte mit Repel - Silane mußte lediglich nach jedem fünften Gellauf erneuert werden. Der Zusammenbau der Thermostatisier- und der Trägerplatte erfolgte immer erst kurz vor der Herstellung der Gele, um eine Vermischung der unterschiedlichen Silane - Beschichtungen durch Diffusion zu verhindern.

### 2.3.1.1.2.3 *Herstellung von Polyacrylamidgelen*

#### Lösungen

##### *Acrylamid - Stammlösung*

Acrylamid / Bis (29:1) (Amresco).....	55,5 ml
Harnstoff ultrapur (Gibco / BRL).....	46,67 g
MilliQ Wasser .....	52,5 ml

##### *Harnstoff – Stammlösung (7M)*

Harnstoff ultrapur (Gibco / BRL).....	210,2 g
MilliQ Wasser ad.....	1000 ml

Zur Lösung wurden 25 ml Ionenaustauscher (mixed bed resin, BioRad, 142-6425) gegeben. Die Lösung wurde vor dem ersten Gebrauch für 30 min gerührt und dann bei 4 °C gelagert.

##### *TBE2 - Puffer, 10fach*

Trizma Base (Sigma T 1503).....	1 M
Borsäure (Merck 165) .....	0,83 M
EDTA (Titriplex III, Merck 8418) .....	10 mM

*Ammoniumpersulfat*

Ammoniumpersulfat.....33 % [w/v]

Ammoniumpersulfat (APS) (BioRad 161-0700) in MilliQ Wasser lösen und in Aliquots zu je 200 µl bei -20 °C aufbewahren.

TEMED (Pharmacia, 17-131301)

*Zusammensetzung des Polyacrylamidgels für die LMW – RNA Analyse*

Acrylamid – Stammlsg. ....47,6 ml

Harnstoff 7 M .....24,4 ml

TBE2 – Puffer, 10fach.....8,0 ml

Lösungen mischen, sterilfiltrieren und entgasen,  
dann unter Rühren zugeben:

APS (33 % [w/v]) ..... 80 µl

TEMED ..... 35 µl

**Durchführung**

Bei der Elektrophorese wurden 12 %ige Polyacrylamid – Gele mit einer Harnstoff – Konzentration von 7 M eingesetzt. Acrylamid - Stammlösung, Harnstoff - Lösung (7 M) und 10 x TBE 2-Puffer wurden in einer Filtrationsapparatur (Sartorius, SM18043E) über einem Celluloseacetatfilter (Schleicher / Schüll, 404112, Ø 47 mm, Porengröße 0,2 µm) unmittelbar vor der Herstellung der Gele gemischt. Die Acrylamid - Gellösung wurde für 15 min unter Vakuum entgast. Unter vorsichtigem Rühren wurden Ammoniumpersulfat und TEMED zugegeben und die Polymerisation somit gestartet. Sofort nach der Zugabe von APS und TEMED wurde das Gel gegossen. Die Polymerisation des Geles war in der Regel nach 20 min erfolgt.

Nach 2 Stunden wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingebaut und die Pufferkammern mit Laufpuffer (1 x TBE2 - Puffer) gefüllt. Der Gelkamm wurde entfernt und die Geltaschen mit dem Laufpuffer gespült.

**2.3.1.1.2.4 Herstellung des Molekulargewichtsstandards**

Als Molekulargewichtsstandard wurden 5S rRNA (120 nt, Boehringer 206911, partiell hydrolysiert), tRNA<sup>phe</sup> (77 nt, Sigma, R-3143) und tRNA<sup>tyr</sup> (86 nt, Sigma, R-0258) von *Escherichia coli* eingesetzt. Um eine Hydrolyseleiter zu erhalten, wurde die 5S rRNA thermisch partiell hydrolysiert. Eine entsprechende Menge 5S rRNA wurde in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß in Auftragpuffer A5 (siehe 2.3.1.1.2.5) gelöst und in einem PCR Thermo – Cycler (Landgraf) für 10 min bei 90 °C inkubiert. Sofort darauf wurde die Hydrolyse in vorgekühltem Ethanol (-70 °C) gestoppt. Partiiell hydrolysierte 5S rRNA, tRNA<sup>phe</sup> und tRNA<sup>tyr</sup> wurden in Fällungsmix ausgefällt, wie in 2.3.1.1.1 beschrieben, und in Auftragspuffer A5 resuspendiert. Die Endkonzentrationen im Auftragpuffer betrugen für die 5S rRNA 1 µg/µl und für die tRNAs jeweils 0,1 µg/µl. Der Molekulargewichtsstandard wurde bei -20 °C gelagert. Pro Gel wurden in der Regel fünf bis sechs Taschen mit je 3 µl des Standards beschickt.

### **2.3.1.1.2.5 Vorbereiten der Proben für die Elektrophorese**

#### **Lösungen**

*Natriumdodecylsulfat – Lösung (SDS) 20 % [w/v] in MilliQ Wasser*

#### *Auftragspuffer A5*

Sucrose (Serva 35579) ..... 1,5 g  
lösen in  
TBE2 – Puffer 1x (siehe 2.3.1.1.2.3) ..... 5 ml  
anschließend lösen:  
Harnstoff ultrapur (Gibco / BRL) ..... 2,3 g  
SDS – Lösung 20 % [w/v] ..... 50 µl  
Bromphenolblau (Sigma B 7021) ..... 5 mg  
Xylen – Cyanol (BioRad 161-0423) ..... 5 mg  
Lagerung bei –20 °C

#### **Durchführung**

Aus den in Fällungsmix gelagerten RNA – Extrakten (zur Herstellung siehe Abschnitt 2.3.1.1.1; zur Konzentrationsbestimmung siehe Abschnitt 2.3.1.1.2) wurden 10 µg RNA entnommen. Die RNA wurde durch 20 minütige Zentrifugation bei 20000x g und 4 °C präzipitiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde dann mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen, um zurückgebliebenes Natriumacetat zu entfernen, welches bei der Elektrophorese die lokale Ionenkonzentration erhöht, die auf die RNA wirkende elektrische Kraft vermindert und dadurch das Laufverhalten der Probe ändert. Nach erneuter 20 minütiger Zentrifugation bei 20000x g und 4 °C wurden die Pellets für 10 -15 min unter Vakuum getrocknet (Savant, SpeedVac), in 4 µl Auftragspuffer A5 durch Auf- und Abziehen mit einer sterilen Pipettenspitze resuspendiert und für 30 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur durchmischt. Dabei entstehende Blasen wurden vor dem Auftragen durch kurze Zentrifugation bei 10000 x g und Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurden die Proben vollständig in die Geltaschen gegeben.

### **2.3.1.1.2.6 Elektrophoresebedingungen**

Die Elektrophorese – Apparatur wurde an Power – Supplies der Firmen BioRad (Power Pac 3000) und Flug (HCN 700M-6500) angeschlossen. Eine Regulation des Stromflusses wurde ausschließlich über die Leistung [W] vorgenommen. Physikalische Parameter des Elektrophoreselaufes können Tabelle 6 entnommen werden.

Vor Beginn des eigentlichen Elektrophorese – Laufes wurde ein Vorlauf für 30 Minuten bei 40 W und 40 °C gestartet. Bei dem Vorlauf wurden die Geltaschen mit Auftragspuffer A5, aber nicht mit RNA - Proben beschickt. Der Vorlauf diente dazu, erstens um das Gel vorzuwärmen, zweitens um nicht polymerisierte Monomere aus dem Gel zu entfernen und drittens, um mit Hilfe des Auftragspuffers das Gel auf Inhomogenitäten im Laufverhalten, z.B: defekte Geltaschen o.ä. zu untersuchen. Nach erfolgtem Probenauftrag wurde der



Hauptlauf zunächst für eine Stunde bei 40 W und 60 °C statt, anschließend wurde die Leistung auf 80 W bei konstanter Temperatur erhöht. Die Elektrophorese wurde zehn Minuten nach Auslauf des Xylen – Cyanol Markers beendet.

	Dauer	Spannung	Strom	Leistung	Temperatur
Vorlauf	30 min – 1 h	~1700 V	~26 mA	40 W (const.)	40 °C
Hauptlauf	1 h	~1700 V	~26 mA	40 W (const.)	60 °C
	1,5 - 2 h	~2500 V	~35 mA	80 W (const.)	60 °C

Ende des Gellaufes: 10 min nach Auslauf des Xylen – Cyanol Markers

Tabelle 6: Elektrophoresebedingungen für die Analyse von LMW – RNA Profilen.

### 2.3.1.1.2.7 Silberfärbung der Gele

#### Lösungen

##### *Saure Methylenblau - Lösung*

Na-Acetat (Merck 6267) .....	0,4 M
Essigsäure (Merck, 10063) .....	0,4 M
Methylenblau (Sigma 7220-79-3) .....	4 g
MilliQ Wasser .....	ad 2 l
pH 4,7	

##### *Dithiothreitol - Lösung*

Dithiothreitol (Sigma D0623) .....	30 mg
MilliQ Wasser .....	ad 1,5 l

##### *Silbernitrat – Färbelösung*

Silbernitratlsg. (in Becherglas unter dem Abzug ansetzen)

Silbernitrat (Riedel de Häen 10220) .....	10 g
MilliQ Wasser .....	25 ml

Getrennt ansetzen: Salmiaklsg.

Ammoniumlösung (25 %, Merck 5432) .....	15 ml
NaOH 1N (Merck 9137) .....	30 ml
MilliQ Wasser .....	1,5 l

Silbernitratlösung tropfenweise in Salmiaklösung eintropfen lassen, so daß keine braune Trübung (durch Ausfällung) eintritt

##### *Entwickler - Lösung*

Zitronensäure (Sigma 7129) .....	0,01 %
Formaldehyd (Riedel de Häen, 33220) .....	0,037 %
MilliQ Wasser .....	1,5 l

Konzentrationsangaben verstehen sich als Endkonzentrationen

##### *Fixierer (Stopplösung)*

Essigsäure .....	0,01 %
MilliQ Wasser .....	1,5 l

Konzentrationsangaben verstehen sich als Endkonzentrationen

## **Durchführung**

Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Methode zur Silberfärbung für LMW – RNA Gele findet sich in (Kolodny, 1984). Alle auf die Spülung mit Dithiothreitol – Lösung folgenden Schritte der Silberfärbung sind lichtempfindlich; Lichtexposition kann Qualitätsminderungen verursachen (z.B. stärkere Hintergrundfärbung). Deswegen befanden sich Gele und Chemikalien während der Färbung in dunklen Plastikboxen. Die Färbeprozedur unterteilt sich in die Vorfärbung mit Methylenblau und die eigentliche Färbung (Hauptfärbung) mit Silbernitrat.

## **Vorfärbung**

Die Gele wurden nach dem Gellauf für 30 min in 1,5 l saure Methylenblau - Lösung gegeben, um einerseits den Harnstoff aus dem Gel zu lösen und andererseits die hier beschriebene ammoniakalische Silberfärbung zu verstärken. Nach erfolgter Vorfärbung wurden die Gele über Nacht in 1,5 l MilliQ Wasser entfärbt. Das zur Entfärbung eingesetzte Wasser wurde mindestens drei Mal gewechselt. Die Methylenblaulösung konnte für 10 Färbungen verwendet werden.

## **Hauptfärbung**

Die vorgefärbten Gele wurden für 45 min in 1,5 l frisch angesetzte Dithiothreitol (DTT) – Lösung gelegt, kurz in MilliQ Wasser gespült und dann für 4 min 30 sec in die frisch angesetzte Silber - Farbe - Lösung gegeben. Es folgte eine zweimalige Spülung der Gele für je 2 min in je 1,5 l MilliQ Wasser. Danach wurden die Gele in 1,5 l Entwickler - Lösung gelegt und leicht geschwenkt. Die Entwicklungszeit betrug zwischen 45 sec und zwei Minuten. Sobald die Hydrolyseleiter des RNA - Standards gut sichtbar wurde und noch keine Hintergrundfärbung aufgetreten war, wurde die Entwicklung gestoppt. Abschließend wurden die Gele für 10 min bis 30 min in Fixierer gelegt, für 30 min in MilliQ Wasser gespült und dann über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### **2.3.1.1.2.8 Dokumentation**

LMW – RNA Profil - Gele wurden auf zwei Arten dokumentiert: Zum einen durch Scannen mit einem Densitometer (Hirschmann Elscript 400-AT), zum anderen durch photographisches Ablichten auf einen Positiv – Film (Kodak X-OMAT RA). Da sich die zur Auswertung relevanten Bandenmuster im unteren Drittel des Geles, also in den letzten 25 cm befanden und die oberen zwei Drittel keine informativen Gelbanden aufwies (16S und 23S rRNA – Fragmente wurden auf dem verwendeten 12 % Polyacrylamidgel nicht gut aufgetrennt) wurden von den 55 cm langen Gelen lediglich die unteren 25 cm (photographische Dokumentation) bzw. 20 cm (computergestützte Auswertung)

dokumentiert. Dem Vorteil der erheblichen Materialeinsparung steht der Nachteil gegenüber, daß sich aus dem dokumentierten Material keine absoluten Rf – Werte für das Laufverhalten

der einzelnen Banden messen lassen. Daraus folgt, daß eine Auswertung sich darauf beschränken muß, die Länge und Intensität der Banden einer Probe in Beziehung zu Länge und Intensität der Banden eines mitlaufenden Standards zu beziehen.

### **Densitometrische Dokumentation**

Entwickelte und getrocknete Gele wurden mit einem Densitometer (Hirschmann Elscript 400-AT) gescannt. Das Densitometer war an einen PC angeschlossen. Mit dem Densitometer konnte das 55 cm lange Gel maximal bis zu einer Länge von 20 cm eingescannt werden.

Die Gele wurden per Transmissionsmessung gescannt. Der das Gel abtastende Lichtstrahl wurde zunächst durch einen Monochromfilter und dann durch eine Lochblende geleitet. Die Messung silbergefärbter Gele ist keine Absorptions - sondern eine Transmissionsmessung. Für den wurde Gelscan ein Grünfilter verwendet, der bei einer Wellenlänge von 546 nm permeabel war, da diese Wellenlänge die relativ höchste Intensität unter allen verfügbaren Linien aufwies. Der Durchmesser der verwendeten Lochblende betrug 0,4 mm. Da die Schrittweite des Scans durch den Durchmesser der Lochblende auf ein Minimum von  $\frac{1}{2}$  der Blendenweite festgelegt wird; unterhalb dieser Schwelle gelangt man in den Bereich der leeren Auflösung; wurde eine Schrittweite von 0,2 mm sowohl in X – als auch in Y – Richtung gewählt. Der Output des Scans wurde als Binär – Datei gespeichert und konnte zur weiteren computergestützten Bildbearbeitung in das TIFF – Format umgewandelt werden.

### **Photographische Dokumentation**

#### **Lösungen**

##### *GBX - Entwickler*

Entwickler GBX (Kodak P7042, St. Louis, USA) mit Leitungswasser gemäß den Empfehlungen des Herstellers angesetzt

##### *GBX – Fixierer*

Fixierer GBX (Kodak P7167, St. Louis, USA) mit Leitungswasser gemäß den Empfehlungen des Herstellers angesetzt

#### **Durchführung**

Wie in 2.3.1.1.2.8 erwähnt, wurden nur die unteren 25 cm des insgesamt 55 cm langen Gels dokumentiert. Die Arbeiten zur photographischen Dokumentation wurden in einer Dunkelkammer unter rotem Licht durchgeführt. Auf einen Positiv – Film (Kodak X-OMAT RA, 8 x 10 inch (entspr. rd. 20 x 25 cm), 142 9760) wurde die Gelplatte mit der Gelseite nach unten gelegt, so daß das Polyacrylamidgel den Film berührte. Dieser Sandwich wurde von oben mit einer Leuchtstoffröhre für 15 bis 25 sec belichtet. Nach der Belichtung wurde der Film für 90 sec unter leichtem Schwenken entwickelt, kurz in Leitungswasser gespült und drei Minuten unter gelegentlichem Schwenken fixiert. Danach wurde der entwickelte Film für 30 Minuten gewässert und anschließend an der Luft getrocknet.

### **2.3.1.1.3 Computergestützte Auswertung der LMW RNA – Profile**

Zur computergestützten Auswertung der LMW – RNA Profile wurden die Programmpakete GelCompar, Version 4.0 und 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) und RFLPScan Version 3.0 (Scanalytics, USA) eingesetzt.

Zunächst wurde die aus dem Scanner – Output erstellte ASCII - Datei mit einem Konvertierungsprogramm (cb2t.exe, Hirschmann) in ein gängiges Standardformat für Bilddateien, das TIFF – Format, umgewandelt. Auf dem erhaltenen Bild wurden manuell die Spuren der Proben definiert, entlang derer die optische Dichte in Abhängigkeit von der Laufstrecke bestimmt werden sollte. Die densitometrischen Profile entlang der definierten Spuren wurden von den Programmpaketen in einem Prozeß bestimmt, der als „Scannen der Gelspuren“ bezeichnet wurde.

Im zweiten Schritt der Auswertung wurden die Gele „normalisiert“. Dieser Schritt beinhaltete eine Normierung der Marker in dem Sinne, daß zum einen dem Computerprogramm mitgeteilt wurde, welche Bande des Markers auf einem Gel welcher Bande des Markers auf einem anderen Gel entsprachen, zum anderen konnten den Banden des Markers metrische Maße zugeordnet werden, z.B. die Länge des Moleküls (in Nucleotiden [nt], z.B.120 nt). In beiden Programmpaketen wurde die Qualität der Normierung anhand von Normierungskurven beurteilt. Die Normierungskurven wurden erhalten, indem die metrischen Maße der Markerbanden (RFLPScan) bzw. die Strecke, um die jeder Bildpunkt der Rohdaten verschoben werden mußte, um das korrekte Alignment zu erhalten (GelCompar) gegen die relative Laufstrecke aufgetragen wurde. Nach der Normierung durften die Kurven in ihrem Verlauf keinerlei Diskontinuitäten aufweisen. Durch den Prozeß der Normierung wurde letztendlich ein Vergleich von Proben ermöglicht, die auf verschiedenen Gelen gelaufen waren, sofern auf diesen Gelen identische Standards aufgetragen worden waren.

Der dritte Schritt der Auswertung beinhaltete die Aufbereitung, Interpretation und Analyse der in den ersten beiden Schritten erstellten und normierten densitometrischen Profile. Zunächst wurde der Hintergrund der densitometrischen Profile reduziert. Dieses geschah entweder manuell durch Editieren der Basislinie (RFLPScan) oder computergestützt mit Hilfe des „rolling disk“ Algorithmus (GelCompar). Dann wurden die einzelnen Banden selektiert und markiert. Die weitere Behandlung der Daten gestaltete sich in den verwendeten Programmpaketen unterschiedlich.

In GelCompar Version 4.0 und 4.1 wurden mit verschiedenen Algorithmen Ähnlichkeitsmatrices gerechnet. Aus den Ähnlichkeitsmatrices wurden durch unterschiedliche Clusteranalyse – Algorithmen Dendrogramme erstellt. Diese Dendrogramme wurden zunächst auf Konsistenz mit einfachen, überprüfbaren Kriterien untersucht. Geforderte Kriterien waren erstens, daß identische Proben aus identischen Rohextrakten, die auf verschiedenen Gelen liefen, in der Repräsentation des Dendrogrammes näher beieinander clustern als Proben unterschiedlicher Organismen; zweitens, daß Proben, die mit dem unbewaffneten Auge betrachtet offensichtlich identisch waren, auch im Dendrogramm zu einem Cluster

zusammengefasst wurden. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, wurde das Dendrogramm als nicht gültig betrachtet. Eine hundertprozentig gültige Repräsentation ließ sich ohne Vorsortieren nach bestimmten Kriterien (z.B. Größe der 5S rRNA, siehe hierzu auch unten) bei keiner Kombination aus den im Programmpaket implementierten Ähnlichkeitsmatrix – und Clustering – Algorithmen erzielen. Für den Vergleich der Proben einer kleinen Anzahl von Gelen lieferten im Sinne obengenannter Kriterien zwei Methoden brauchbare Ergebnisse, erstens eine Kombination aus einer Ähnlichkeitsberechnung nach (Pearson, 1926) (Produkt – Moment Korrelation, eine Ähnlichkeitsberechnung, bei der nicht Banden, sondern die gesamten densitometrischen Kurven miteinander verglichen werden) mit UPGMA – oder NJ – Clustering sowie zweitens, bei Verwendung von bandenbasierten Ähnlichkeitsberechnungen, der implementierte fuzzy – logic clustering Algorithmus. Voraussetzung hierfür war, daß die auf den Gelen nicht optimal aufgelösten Klasse 1 – transfer RNAs aus den Berechnungen herausgenommen wurden und die im Programmpaket implementierte globale Fehlerkorrektur aktiviert wurde, um Mikro – Inhomogenitäten im Gellauf nicht in die Berechnungen mit einfließen zu lassen.

Ein anderer Weg der Auswertung wurde mit dem Programmpaket RFLPScan, Version 3.0, verfolgt. Nach manueller Markierung der Banden wurden die Daten in eine Datenbank (im proprietären \*.mdb (Microsoft Access Database) – Format exportiert. Diese Datenbank enthielt numerische Werte wie z.B. Anzahl der Banden pro Spur sowie Länge, optische Dichte, absolute und relative Intensität der einzelnen Banden und konnte mit Hilfe von Standard – SQL (Standard Query Language) Befehlen durchsucht werden. Auf diese Weise ließen sich mit den Verknüpfungsparametern *AND*, *NOT* und *OR* charakteristische Merkmalskombinationen für einzelne Proben suchen und Subdatenbanken erstellen. Die Suche ließ sich nach verschiedenen Kriterien gliedern, für die sich Prioritäten setzen ließen. Wichtigste Kriterien für den Vergleich der Ähnlichkeit war die Länge der 5S rRNA in Kombination mit Vorhandensein oder Abwesenheit von niedermolekularer Fragmente der 23S rRNA mit einer Größe zwischen 120 und 140 nt, indikativ für die Gruppe der  $\alpha$  - Proteobakterien. Zweite Priorität hatte das Vorhandensein oder die Abwesenheit von sehr spezifischen Banden, beispielsweise einzelne, sehr charakteristische Klasse II – tRNA Banden oder die unterhalb des Klasse I - tRNA Pools lokalisierte *Pseudomonas* – Bande, indikativ für den Genus *Pseudomonas sensu stricto* (Höfle, 1992a): Dritte Priorität besaßen die übrigen Klasse II – tRNA Banden und an letzter Stelle wurde der Klasse I - tRNA – Pool berücksichtigt.

Die densitometrischen Profile wurden nach ihrer Ähnlichkeit geordnet. Bakterienstämme, deren niedermolekulare RNAs identische densitometrische Profile besaßen, wurden zu „operational taxonomic units“ (OTU) zusammengefaßt. OTUs, die aufgrund von identischen LMW – RNA Profilen zusammengefaßt wurden, werden im Folgenden als LMW – RNA OTUs bezeichnet.

## 2.3.1.2 16S rRNA - Gensequenzierung

### 2.3.1.2.1 Technik der Sequenzierung von 16S rRNA – Genen

#### 2.3.1.2.1.1 Verwendete Primer

Folgende Primer wurden zur Sequenzierung der 16S rRNA Gene mediterraner Isolate verwendet:

Name des Primers	Sequenz des Primers	eingesetzt zur
16-F-27	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	PCR, SEQ
16-R-1525	5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3'	PCR
16-F-26euk	5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3'	PCR, SEQ
16-R-1514euk	5'-TGA TCC TTC CGG AGG TTC ACC-3'	PCR, SEQ
16-F-357	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	SEQ
16-F-530a	5'-TTC GTG CCA GCA GCC GCG G-3'	SEQ
16-F-945	5'-GGG CCC GCA CAA GCG GTG G-3'	SEQ
16-F-1103	5'-TGT TGG GTT AAG TCC CGC AAC-3'	SEQ
16-R-518	5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	SEQ
16-R-907	5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'	SEQ
16-R-1087	5'-CTC GTT GCG GGA CTT AAC CC-3'	SEQ
16-R-1492	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	PCR, SEQ

Tabelle 7: Zur Sequenzierung der 16S rRNA Gene mediterraner Isolate verwendete Primer. Nomenklatur der Primer: 16 steht für 16S rRNA, F (Forward) bezeichnet Primer in 5'→3' Richtung der 16S rRNA - Sequenz, R (Revers) bezeichnet 3'→5' orientierte Primer in Bezug auf die Sequenz der 16S rRNA, Zahlenangaben bezeichnen die Position des 3' – Nucleotides des Primers, bezogen auf die *E. coli* – homologe Position des 16S rRNA Gens. Abkürzungen: PCR, zur PCR - Amplifikation eingesetzt; SEQ, zur Sequenzierung eingesetzt. Primer sind entnommen aus Lane (1991).

#### 2.3.1.2.1.2 Zellysis zur Gewinnung eines DNA – haltigen Zellysates

### Lösungen

#### Alkalischer Lysis – Puffer

NaOH ..... 50 mM  
SDS..... 25 % [w/v]

*TE – Puffer pH 8,0 (Hultling et al., 1995)*

Tris-HCl.....	10 mM
EDTA .....	1 mM
pH 8,0 bei 25 °C	

*PCR – Puffer (10 fach)*

Tris-HCl.....	20 mM
KCl .....	25 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	1,5 mM
Tween 20 .....	1,05 % [v/v]
Gelatine (Serva).....	0,1 mg/ml
pH 8,3 bei 25 °C	

**Durchführung**

Es war nicht möglich, aus den RNA – Extrakten, deren Herstellung in Abschnitt 2.3.1.1.1.1 beschrieben wurde, 16S rRNA – Gene zu amplifizieren. Deswegen mußte Template – DNA für die Amplifikation der 16S rRNA Gene aus Biomasse der zu untersuchenden Stämme hergestellt werden. Zur Gewinnung von Template – DNA für eine erfolgreiche PCR der 16 S rRNA Gene mediterraner Isolate war es allerdings nicht notwendig, aufwendig isolierte DNA als Template zu verwenden. Als Ausgangsmaterial konnte einfach ein DNA – haltiges Zellysat eingesetzt werden. Zu untersuchende Bakterienstämme wurden auf den entsprechenden Medien herangezogen ( siehe 2.2.3.2, 2.2.1.1). Mit einer abgeflamten Impföse wurde etwas Zellmaterial entnommen, in 500 µl TE - Puffer (pH 8,0) gewaschen, anschließend in 50 µl alkalischem Lysismix oder 100 µl PCR - Puffer + 1 % Tween 20 resuspendiert und für 15 min bei 95 °C (PCR – Cyclex, Landgraf) aufgeschlossen. Die entstehenden Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 18200x g (Biofuge 15, Heraeus Sepatech) entfernt, der Überstand entnommen und bei -20 °C aufbewahrt. Bei Verwendung von alkalischem Lysismix wurde der Überstand nach dem Zentrifugationsschritt 1:10 mit dest. Wasser verdünnt und dann bei -20 °C eingefroren.

**2.3.1.2.1.3 PCR – Amplifikation des 16 S rRNA – Gens**

Als Ausgangsmaterial für die Sequenzierung der 16S rRNA – Gene der zu untersuchenden Stämme wurden bakterielle Lysate, deren Herstellung in Abschnitt 2.3.1.2.1.2 beschrieben wurde, eingesetzt. Für prokaryotische Stämme wurden die eubakteriellen Primer 16-F-27 und 16-R-1525 bzw. 16-R-1492 zur Amplifikation eingesetzt, für eukaryotische Isolate fanden die Primer 16-F-26euk und 16-R-1514euk Verwendung. Die Amplifikation wurde in Volumina von 100 µl in einem Gene – Amp 9600 (Perkin Elmer) durchgeführt. Zur Kontrolle auf eine eventuelle Kontamination der Reagenzien oder unspezifische Amplifikation wurde standardmäßig eine Negativkontrolle mit identischen Reaktionsansätzen, aber ohne Template – DNA mitgeführt. Die Nullkontrolle durfte nach Abschluß der PCR kein

Amplifikationsprodukt aufweisen. Reaktionsansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

dNTPs (Pharmacia) .....	800 µM je Nucleotid
PCR – Puffer 10x.....	10 µl
Forward Primer.....	600 nM
Reverse Primer .....	600 nM
Taq - Polymerase (Perkin Elmer).....	2,5 U
Template.....	1 µl
MilliQ Wasser autoklaviert .....	ad 100 µl

Die PCR - Amplifikation erfolgte nach folgenden Parametern:

30 Zyklen	120 sec.....	95 °C	einleitende Denaturierung
	60 sec.....	94 °C	Denaturierung
	60 sec.....	55 °C	Annealing
	180 sec.....	72°C	Elongation
	10 min.....	72°C	terminale Elongation

### 2.3.1.2.1.4 Kontrolle der PCR durch Agarose – Gelelektrophorese

#### Lösungen

##### *TAE – Puffer*

Tris - Acetat.....	40 mM
EDTA .....	1 mM
pH 8.0 bei 25 °C	

Angesetzt als 50fache Stammlösung und vor Gebrauch verdünnt.

##### *Auftragspuffer*

Bromphenolblau .....	0,25 % [w/v]
Xylen - Cyanol .....	0,25 % [w/v]
Glycerin (Endkonzentration) .....	30 % [v/v]

#### Durchführung

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden in einem 0,8 %igem [w/v] Agarosegel (FMC Seakem LE) in TAE - Puffer aufgetrennt. Dazu wurden 3 µl des jeweiligen Amplifikationsproduktes mit 2 µl Auftragspuffer versetzt und bei einer Spannung von 120 V für 30 min aufgetrennt. Verwendet wurden eine Elektrophoreseeinheit Horizon 11•14 (Gibco) in Verbindung mit einem Stromversorger Power Supply Model 200/2.0 (BioRad). Als Größenstandard wurde eine 1 kb – DNA – Fragment - Leiter (Stratagene # 201115) benutzt. Für das amplifizierte DNA-Fragment wurde eine Größe von ca. 1,5 kb erwartet.



Dokumentiert wurden die Agarosegele, indem sie nach dem Elektrophoreselauf für 10 min mit Ethidiumbromid – Lösung angefärbt, für 10 min in MilliQ – Wasser gewaschen und mit UV – Licht bei 260 nm auf einem EASY – Video – Dokumentationssystem (Herolab, Wiesloch) photographiert wurden. Das EASY – System war an einen PC angeschlossen und ermöglichte die Speicherung der Gelbilder im TIFF – Format.

### **2.3.1.2.1.5    *Aufreinigung der PCR - Amplifikationsprodukte***

Die Aufreinigung erfolgte mit Microcon 100-Säulen (Amicon, # 42413) nach Anleitung des Herstellers. Die Säulen fungieren als Molekularsiebe, nicht permeabel für die PCR - Produkte aber durchlässig für niedermolekulare Substanzen. Durch dreimalige Zentrifugation, bei der das Retentat immer wieder mit destilliertem Wasser verdünnt wird, können so niedermolekulare Substanzen (Nucleotide, Primer, Salze) aus dem PCR – Ansatz ausgewaschen werden. Das gereinigte PCR – Produkt wird anschließend durch Zentrifugation der umgekehrt auf ein Eppendorf – Reaktionsgefäß aufgesteckten Säule vom Filter heruntergewaschen. 100 µl PCR – Produkt (siehe 2.3.1.2.1.3) wurden mit 400 µl autoklaviertem MilliQ Wasser in das auf einem Zentrifugen – Reaktionsgefäß aufgesteckte Microtube – Filtrationsgefäß gegeben und für 8 min bei 2000x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Zu dem Retentat der Filtration wurden noch zwei Mal 500 µl autoklaviertes MilliQ Wasser gegeben und für 10 min bei 2000x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde das Microtube – Reaktionsgefäß mit dem Retentat herumgedreht und auf ein frisches Zentrifugen - Reaktionsgefäß gesteckt, so daß das Retentat durch Zentrifugation für drei Minuten bei 1000x g und Raumtemperatur im Reaktionsgefäß aufgefangen werden konnte. Das Retentat der Microcon – Säulen mit einem Volumen von ca. 3 – 4 µl wurde, je nach Stärke der in der Agarose – Gelelektrophorese nachgewiesenen Bande, mit autoklaviertem MilliQ – Wasser auf ein Volumen zwischen 20 und 100 µl aufgefüllt und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.3.1.2.1.6    *Sequenzierung***

Die amplifizierte 16S rDNA wurde mittels einer Kettenabbruch - Reaktion nach einer Modifikation der Didesoxymethode von Sanger (1977) sequenziert. Die Kettenabbruchreaktion wurde nach dem Prinzip einer asymmetrischen PCR (Lee *et al.*, 1992) unter Verwendung von Taq – DNA - Polymerase (Perkin Elmer), Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) und jeweils einem der in Tabelle 7 aufgeführten Primern durchgeführt. Als Terminatoren dienten dabei basenspezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs. Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 20 µl und wurden wie folgt zusammenpipettiert:

Premix (Perkin Elmer).....	8 µl
Primer [5 pM].....	2 µl
Template.....	3 – 5 µl, ca. 1 µg
H <sub>2</sub> O.....	ad 20 µl

Das sogenannte Cycle - Sequencing wurde in 20 µl- Reaktionsansätzen in einem GeneAmp 9600 - Thermocycler (Perkin - Elmer) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

25 Zyklen	15 sec.....	96 °C	Denaturierung
	60 sec.....	55 °C	Annealing
	140 sec.....	60 °C	Elongation, Kettenabbruch
	10 min.....	72 °C	terminale Elongation

Die DNA-Fragmente wurden durch Zugabe von 3 µl Natriumacetat [2 M] und 50 µl Ethanol [95 %] bei Raumtemperatur für 1 h gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 18200x g wurde der Überstand dekantiert, das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgezogen, das Pellet 5 min in einer Speed Vac (DNA Speed Vac® DNA 110, Savant) getrocknet und in 3 µl Ladepuffer (deionisiertes Formamid, 25 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Proben wurden dann 2 min bei 90 °C denaturiert, 2 min in Eis gestellt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel (8 M Harnstoff) aufgetragen und in einem ABI – Sequenziergerät, Modell 377 für 16 h bei konstanter Leistung von 38 W aufgetrennt. Die Detektion der fluoreszierend markierten DNA - Fragmente erfolgte im unteren Gelbereich nach Anregung durch einen langwelligen Laserstrahl. Die Signalverstärkung, die Analyse der Bandenmuster und die Sequenzbestimmung erfolgte im Anschluß an den Gellauf mit dem systemeigenen Programm. Einzelheiten über Gelvorbereitung und Lauf sind der Arbeit von Mau (1996) zu entnehmen.

### **2.3.1.2.1.7 Auswertung der 16S rRNA Gensequenzen**

16S rRNA Gensequenz - Daten wurden mit Hilfe des ARB Programmpaketes (Strunk *et al.*, 1998), (Strunk *et al.*, 1999) ausgewertet. Die Nucleotidsequenzen wurden mit Referenzsequenzen von 16S rRNA und 16S rRNA – Genen unter Berücksichtigung konservierter Primärstrukturen und Sekundärstrukturen (Gutell *et al.*, 1985) verglichen. In einem als Alignment bezeichneten Prozess wurden zueinander homologe Nucleotidpositionen in vertikalen Spalten angeordnet. Um den Einfluß multipler Substitutionen im Sequenzvergleich zu minimieren, wurden nur Nucleotidpositionen in den Vergleich einbezogen, in denen ein einzelnes Nucleotid eine Abundanz von wenigstens 50 % aufwies (Ludwig *et al.*, 1998). Evolutionäre Distanzen wurden ausschließlich aus dem Vergleich homologer und unzweideutig determinierter Sequenzpositionen bestimmt. Phylogenetische Bäume wurden ausschließlich aus nahezu vollständigen 16S Sequenzen errechnet (siehe Ludwig *et al.* (1998)). Partialsequenzen wurden mit Hilfe der im ARB-Programmpaket angepassten Maximum Parsimony Methode nachträglich in Referenzdendrogramme aus nahezu vollständigen 16S rRNA-Gensequenzen eingerechnet (Strunk *et al.*, 1998), (Strunk *et*

*al.*, 1999) (siehe für Details und Diskussion hierzu Abschnitt 4.2.4.3). Verschiedene Algorithmen (Distanzmatrix - Methoden, Maximum Parsimony – und Maximum Likelihood Algorithmen) wurden zur Baumberechnung eingesetzt und deren Ergebnisse miteinander verglichen. Hinsichtlich der Einordnung der in dieser Untersuchung erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen lieferten alle Methoden übereinstimmende, konsistente Aussagen. In dieser Untersuchung wurden die nach dem Distanzmatrix- basierten Algorithmus von Fitch (1967) in der Implementation des PHYLIP – Programmpaketes (Felsenstein, 1989) errechneten Dendrogramme abgebildet, um einen konsistenten Vergleich der Ergebnisse der 16S rRNA-Genanalysen unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen zu gewährleisten. Den Fitch – Dendrogrammen zugrundeliegende Distanzmatrices wurden aus den Sequenzdaten nach Korrektur für multiple Sunstitutionen gemäß dem Modell von Jukes und Cantor (1969) errechnet. Aus den Distanzmatrices wurden Dendrogramme unter Verwendung der Option „Global Rearrangements“ erstellt.

## **2.3.2 Analyse der Umweltproben**

### **2.3.2.1 Kombinierte DNA – RNA Extraktion**

#### **2.3.2.1.1 Allgemeines**

Bei der Extraktion von Nucleinsäuren aus Umweltproben waren wegen der niedrigen metabolischen Aktivität und der geringen Zellzahlen besonders im tieferen Wasserkörper nur geringe Mengen extrahierbarer DNA und RNA als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen zu erwarten. Insbesondere für die Analyse der niedermolekularen RNAs durch LMW – RNA Profile (siehe 2.3.2.3), bei der kein PCR – bzw. RT - PCR Schritt vorgeschaltet war, mußten allerdings möglichst hohe RNA – Mengen eingesetzt werden. Deswegen war es nicht möglich, aus einem Gesamt – Nucleinsäureextrakt durch DNase – bzw. RNase – Verdau die betreffende Nucleinsäurefraktion zu isolieren und einzusetzen. Deswegen wurde ein Protokoll entwickelt, das es ermöglichte, RNA und DNA einer Umweltprobe während der Extraktion zu fraktionieren und somit separat zu extrahieren. Dabei wurde ausgenutzt, daß sich in wäßrigen Lösungen DNA bei pH – Werten im sauren Bereich nicht löst (siehe Mangan (1997)). Bei einer Phenol – Extraktion im niedrigen pH – Bereich (unter pH 5) sammelt sich DNA in der Interphase an, während die wäßrige Phase faktisch DNA – freie, gelöste RNA enthält. Nach Entfernen der wäßrigen, RNA – haltigen Lösung kann nun die DNA gelöst werden, indem der pH – Wert der phenolischen und der Interphase mit einer basischen, wäßrigen Lösung auf pH 7 oder höher eingestellt wird. Dieses Protokoll funktioniert mit einer Vielzahl von Detergenzien, beispielsweise SDS oder SLS. (Mangan *et al.*, 1997) untersuchte eine Vielzahl chaotroper Detergenzien im Hinblick auf effiziente Extraktion von Mycobakterien. Mycobakterien sind gram – positive Bakterien mit sehr festen Zellwänden, die sich in einem Zellaufschluß extrem refraktär verhalten.

### 2.3.2.1.2 Methodik

#### Lösungen

##### *Divolab Extraktionsmix*

Divolab No.1 (Diversey Lever, UK) .....9,6 ml

Natrium – Acetat pH 4.0 [0,5 M] .....24 ml

MilliQ Wasser autoklaviert .....66,4 ml

Natrium – Acetat – Lösung und MilliQ Wasser wurden gemischt und autoklaviert, Divolab- Detergenz (DiverseyLever Lt, Northampton, UK, No. 004564F) wurde nach dem Autoklavieren zugefügt.

##### *Tris Base [1M]*

Tris Base.....12,1 g

MilliQ Wasser .....100 ml

Die Lösung wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

##### *Chloroform – Isoamylalkohol 24:1 [v/v]*

*Weitere verwendete Ansätze siehe Abschnitt 2.3.1.1.1*

##### *Geräte*

- Mikrodismembrator II (Braun Melsungen, 893162/4, Amplitude 15 mm)
- Teflon - Extraktionszellen (Braun Melsungen, 854495/6; Volumen 20 ml)
- Glasperlen, mit Durchmesser von 2 und 3 mm, ausgeglüht (4 h 450 °C) und silikonisiert (nach (Sambrook *et al.*, 1989))
- Mikrozentrifugenröhrchen (Anapore, Whatman, Porengröße 0,2 µm, # 68300202)

#### Durchführung

##### **RNA – Extraktion**

Teflon - Extraktionszellen wurden jeweils mit 2 g silikonisierten Glasperlen mit einem Durchmesser von 2 bzw. 3 mm bestückt und 5 ml Divolab - Extraktionsmix wurde vorgelegt. Die gefrorenen Filtersandwichs (siehe 2.1.3.2) wurden mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in die Extraktionszellen gegeben. Nach der Zugabe von 5 ml puffergesättigtem Phenol (pH 4,2) wurden die Teflon - Extraktionszellen geschlossen in den Mikrodismembrator II (Braun Melsungen, 893162/4) eingespannt und für 2 min mit einer Amplitude von 15 mm geschüttelt. Das Homogenat wurde dann vollständig in 50 ml – Falcon - Röhrchen überführt und für 20 min bei 7200x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere wäßrige Phase in ein 15 ml - Greiner - Röhrchen überführt. Die Teflon - Extraktionszellen wurden mit 2 ml Divolab - Extraktionsmix gespült, der Puffer und 2 ml puffergesättigtes Phenol [pH 4,2] wurden dann auf die Filtermasse in den Falcon - Röhrchen gegeben. Nach erneuter Homogenisation der Filtermasse durch Vortexen wurde nochmals für 20 min bei 7200x g und 4° C zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde dann

mit dem ersten Überstand vereinigt und mit dem einfachen Volumen einer 3 M Na - Acetat - Lösung versetzt. Die im 50 ml Falcon – Tube zurückgebliebene phenolische Phase wurde mit 5 ml Tris Base – Lösung [1M] versetzt, durch Vortexen homogenisiert und für mindestens eine Stunde bei 4 °C gelagert. Um das Phenol vollständig zu entfernen, wurde zweimal mit je 1 Volumen Chloroform gewaschen und zur vollständigen Phasentrennung jeweils 10 min bei 11000x g und 4 °C zentrifugiert. Der letzte klare wäßrige Überstand wurde dann mit dem einfachen Volumen Isopropanol bei -20 °C über Nacht gefällt.

Die gefällte RNA wurde durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 19000x g und 4 °C pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit dem einfachen Volumen eiskalten Ethanol [70 %] gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 10 min bei 19000x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70 % [v/v]) in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und noch einmal für 10 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet unter Vakuum in einer SpeedVac für 10 min getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet für mindestens 45 min unter leichtem Schütteln in 300 µl frisch autoklaviertem MilliQ Wasser gelöst.

Zur Entfernung von Glasfasern und Fusseln wurde die gelöste RNA in einem sterilen Mikrozentrifugenfilter (Anapore, Whatman) für 15 min bei 10000x g abzentrifugiert. Anschließend wurde die RNA - Konzentration bestimmt. Die gereinigte RNA wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens Fällungsmix gefällt und bei -20 °C aufbewahrt.

## **DNA – Extraktion**

Die mit 5 ml [1M] Tris – Base pH 10,5 versetzte phenolische Phase und Interphase wurden, nach Ablauf der ein – bis höchstens dreistündigen Inkubation bei 4 °C, geschüttelt und zur Phasentrennung bei 2000x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die klare, wäßrige Phase wurde abpipettiert und in frische 15 ml Greiner – Röhrchen überführt. Zu der Inter – und der phenolischen Phase wurden weitere 2 ml [1 M] Tris – Base pH 10,5 gegeben, erneut geschüttelt und bei 2000x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgehoben und in das Greiner – Röhrchen mit der wäßrigen Phase des ersten Durchganges gegeben. Das Falcon Tube mit der phenolischen und der Interphase wurde verworfen. In das Greiner Tube mit der wäßrigen Phase wurden 5 ml Chloroform – Isoamylalkohol 24:1 gegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Suspension zur Phasentrennung für 5 min bei 2000x g und 4° C abzentrifugiert, die organische Phase verworfen, der wäßrige Überstand in ein frisches Greiner – Röhrchen überführt und mit dem einfachen Volumen Isopropanol sowie dem 0,1fachen Volumen [3 M] Natrium – Acetat pH 4,2 über Nacht bei -20 °C ausgefällt.

Die Resuspension der DNA wurde analog wie für die Resuspension der RNA durchgeführt. Gefällte DNA wurde durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 19000x g und 4 °C pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit dem einfachen Volumen eiskalten Ethanol [70 %] gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 10 min bei 19000x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70 % [v/v]) in ein

frisches Eppendorfgefäß überführt und noch einmal für 10 min bei 20000x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet unter Vakuum in einer SpeedVac für 10 min getrocknet und anschließend für mindestens 45 min unter leichtem Schütteln in 300 µl frisch autoklaviertem MilliQ Wasser gelöst. Von der Extraktionsprozedur zurückgebliebene Glasfusen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 20000g und 4 °C pelletiert, die wäßrigen 300 µl DNA – Lösung mit einer sterilen Eppendorf – Pipette in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit dem 2,8fachen Volumen Fällungsmix (840 µl) vermischt. Die DNA – Fällung mit einem Gesamtvolumen von 1140 µl wurde bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **2.3.2.2 Fluorimetrische Messung der DNA - RNA Konzentration**

#### **2.3.2.2.1 Fluorimerische Messung zur Kalibrierung der fraktionierten DNA – RNA Konzentration**

##### **Lösungen**

###### *Tris - Calcium Puffer*

Tris – HCl pH 7,5 .....	200 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	100 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	20 mM

##### **Vorbereitung**

Die fraktionierte DNA – RNA – Extraktion wurde mit Referenzstämmen verschiedener taxonomischer Positionen getestet: Zellen der Stämme *Arthrobacter globiformis* DSM 20124 T (*Actinobacteria*) , *Cytophaga johnsonae* DSM 2064 T (*Cytophaga – Flavobacterium*), *Escherichia coli* DSM 613 (γ - Proteobakterien) und *Ralstonia eutropha* DSM 531 T (β - Proteobakterien) wurden in NB – Flüssigmedium bei 30 °C herangezogen, abzentrifugiert, homogen in steriler Saline (0,85 % NaCl) resuspendiert und 100 ml der Suspension auf 0,2 µm Polycarbonat / GFF – Filtersandwiches gesammelt. Ebenso wurde die Zellmasse einer durch ein 10 µm Nylonnetz und einem 3 µm Polycarbonatfilter vorfiltrierten Wasserprobe eines Volumens von 5 l aus dem GBF – Teich, einem institutseigenen goldfischbestückten Gartenteich, durch Filtration auf 0,2 µm Polycarbonat / GFF Filtersandwich gesammelt. Die Filtration wurde durchgeführt, wie in 2.1.3.2 beschrieben. Aliquots der bakteriellen Suspensionen und der Umweltprobe wurden in Glutaraldehyd (2 % Endkonzentration) konserviert, mit 4'6 – diamidino – phenylindol (DAPI, Endkonzentration 1 µg ml<sup>-1</sup>) gefärbt und durch Epifluoreszenzmikroskopie ausgezählt, wie in (Turley, 1993) beschrieben.

## Durchführung

Bakterielle DNA und RNA wurde mit der Methode nach Jeffrey et al. (Jeffrey *et al.*, 1996) gemessen. In ein Eppendorf – Reaktionsgefäß wurde Triton 100 [Endkonz. 5%] zu den Filtern mit Bakterien und Tris – Calcium Puffer gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Bakterien in einem Eisbecher gekühlt und mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Nadeldurchmesser 4 mm, Labsonic U 2000) bei 70 Watt aufgeschlossen. Die optimale Beschallungszeit betrug für alle Stämme 60 Sekunden. Anschließend wurden Zelltrümmer und Filterreste durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 g und 4 °C pelletiert und 100 µl des Überstandes in eine Niedrig – Fluoreszenz Mikrotiterplatte (CytoPlate, Millipore) zum RNase Verdau und der Bestimmung der Nucleinsäure – Konzentration überführt. Pro 100 µl Probenvolumen wurden 2,5 µl einer 1 mg ml<sup>-1</sup> konzentrierten RNase – Lösung (Ribonuclease A, Typ III-A; Sigma R-5125) zugegeben, deren kontaminierende DNase – Aktivität durch Hitzebehandlung inaktiviert worden war. Der RNase – Verdau wurde für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Die Gesamt - Nucleinsäurekonzentrationen wurden durch Zufügen von 100 µl einer 1:500 verdünnten YO-PRO-1 Lösung (1 mM YO-PRO-1 Jodid Stammlösung in DMSO, Molecular Probes Y-3603) in Tris – Calcium Puffer bestimmt. DNA – Konzentrationen wurden durch Zufügen von 100 µl einer 1,0 x 10<sup>-7</sup> M Höchst 33258 (Höchst 33258 Bisbenzimid, Sigma B-2883) in Tris – Calcium Puffer bestimmt. RNA Konzentrationen wurden durch Subtraktion der Gesamt – Nucleinsäurekonzentration mit der DNA – Konzentration berechnet entweder aus der Messung mit Höchst 33285 oder der Messung von RNase verdauter Gesamtnucleinsäure mit YO-PRO-1. Die DNA – und RNA – Konzentrationen wurden schließlich durch Zufügen von 100 µl einer 1:1000 Verdünnung von YO-PRO-1 in Tris – Calcium Puffer zu 5 µl Probe bestimmt, welche etwa 5 % der extrahierten Nucleinsäure – Menge enthielt. Die Vermessung der Proben wurde in einem Cytofluor 2350 Fluoreszenz – Meßsystem (Millipore) bestimmt, für YO-PRO-1 bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm ± 10 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm ± 12,5 nm und für Höchst 33258 bei einer Anregung von 360 nm ± 20 nm und einer Emission von 530 nm ± 12,5 nm.

### 2.3.2.2.2 Fluorimetrische Messung extrahierter Nucleinsäuren aus marinen Umweltproben

#### Lösungen

TE – Puffer pH 7,0

Tris-HCl..... 10 mM  
EDTA ..... 1 mM  
pH 8,0 bei 25 °C

Ribo – Green Working Solution

Ribo – Green ..... 1:2000 in TE – Puffer pH 7,0

## Pico – Green Working Solution

Pico – Green ..... 1:2000 in TE – Puffer pH 7,0

### **Durchführung**

Die Konzentration der DNA in Umweltproben wurde mit dem Farbstoff Pico – Green (P-7581, Molecular Probes Inc., Göttingen), die Konzentration der RNA mit dem Farbstoff Ribo – Green (R-11491, Molecular Probes Inc., Göttingen) bestimmt. Unmittelbar nach der Homogenisierung durch Vortexen wurden den in Fällungsmix gelagerten Proben (siehe 2.3.2.1.2) eine Nucleinsäuremenge entnommen, die dem Äquivalent von 100 ml einer Wasserprobe entsprach. Nucleinsäuren wurden bei 18200x g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert, das Pellet in einer SpeedVac (Savant) getrocknet, in 100 µl TE – Puffer pH 7,0 aufgenommen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst. Zur Messung der Nucleinsäure – Konzentration wurden die gelösten 100 µl DNA – Proben mit 100 µl Pico Green Working Solution vermischt, die gelöste RNA – Probe analog mit 100 µl Ribo – Green Working Solution. Das resultierende Volumen von 200 µl je Probe wurde in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte transferiert und die Fluoreszenz in einem Titertek Fluoroscanner II – Fluorimeter (Labsystems Finnland) gemessen bei einer Anregungswellenlänge von ~ 480 nm sowie einer Emissionswellenlänge von ~ 520 nm. Alle Proben wurden zusammen mit einer DNA – bzw. RNA – Eichreihe auf einer Mikrotiterplatte vermessen.

DNA – bzw. RNA Eichreihen wurden wie folgt erstellt: Mit Kalbs – Thymus dsDNA (Sigma D-1501) bzw. Escherichia coli 16S + 23S rRNA (Boehringer Mannheim, No. 206983) wurde eine 2 µg/ml Stammlösung in TE – Puffer pH 7,0 erstellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen sowie der daraus erhaltenen Verdünnungen der ersten Stufe mit Zielkonzentrationen von 1 µg/ml und 100 ng/ml wurden vermessen, indem die  $A_{260}$  bestimmt (zur Durchführung siehe Abschnitt 2.3.1.1.2) und aus den erhaltenen  $A_{260}$  - Werten die dsDNA bzw. RNA – Konzentrationen ermittelt wurden. Dabei wurde zugrundegelegt:

dsDNA:  $A_{260} = 0,04$  ..... entspricht ..... 2 µg/ml dsDNA

RNA  $A_{260} = 0,05$  ..... entspricht ..... 2 µg/ml RNA

Aus den Verdünnungen der ersten Stufe wurden durch Verdünnungen in 1:10er Schritten die Eichreihen erstellt.

### **2.3.2.3 LMW – RNA Profile der Umweltproben**

#### **2.3.2.3.1 Elektrophoresesysteme und Gelvorbereitung**

Die Elektrophoresesysteme sowie die Herstellung und Handhabung der Polyacrylamidgele wurden in Abschnitt 2.3.1.1.2 beschrieben.



### 2.3.2.3.2 Radioaktive Markierung von RNA mit T4 RNA Ligase

#### Lösungen

##### Ligationsmix

ATP .....	0,015 mM
HEPES, pH 8,3 .....	0,086 M
MgCl <sub>2</sub> .....	0,034 M
Dithiothreitol (DTT) .....	6,6 mM
Dimethylsulfoxid (DMSO) .....	11 %
Hexaminkobaltchlorid (HCC) .....	1 mM
T4 RNA Ligase .....	0,5 U/μl
Polyethylenglycol (PEG) .....	1,5 %

Polyethylenglycol wurde als letzte Komponente hinzugegeben.

##### Fällungsmix FM0

Ethanol p.A. ....	1 ml
Natrium – Acetat [3 M] .....	30 μl

#### Durchführung

Die Ligation der RNA am 3' - Ende mit [5'-<sup>32</sup>P] (pCp) (Amersham) und T4 RNA - Ligase (Pharmacia, 27-0883) erfolgte in 10 μl Ansätzen. Eine RNA - Menge, die der extrahierbaren Gesamt – RNA Menge aus 2 Litern Meerwasser - Probe entsprach, wurde aus einer Ethanol - Fällung entnommen und durch Zentrifugation für 20 min bei 20000x g und 4 °C präzipitiert, zweimal mit eiskaltem Ethanol (70 % [v/v]) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die RNA wurde anschließend in 10 μl Ligationspuffer 1 gelöst. Nach der Zugabe von 10 μCi Cytidin- 3',5'-Bisphosphat [5'-<sup>32</sup>P] (pCp) (Amersham, PB 100208, 10 μCi/1 μl) wurden die Proben für 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Ligation wurde durch die Zugabe von 31 μl Fällungsmixtur FM0 gestoppt und die RNA zur Fällung über Nacht bei - 20 °C aufbewahrt. Die Proben wurden wie unter beschrieben für die Elektrophorese vorbereitet, allerdings wurde vor der Trocknung der Pellets zweimal mit 40 μl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, um nicht eingebautes pCp zu entfernen.

### 2.3.2.3.3 Herstellung radioaktiver Molekulargewichtsstandards

#### Lösungen

##### Alkalischer Hydrolyse - Puffer

NaHCO <sub>3</sub> .....	0,15 M
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	0,15 M
EDTA .....	1 mM

Der pH - Wert von 9,2 wurde mit 5 N HCl eingestellt und bei - 20 °C gelagert.

## **Durchführung**

10 µg radioaktiv markierte 5S rRNA von *Escherichia coli* (Boehringer 206911) wurde in Reaktionsgefäße gegeben, präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Nach Zugabe von 10 µl alkalischem Hydrolyse - Puffer wurden die Proben für 6 min bei 90 °C inkubiert. Die Hydrolyse wurde anschließend auf Eis gestoppt und mit Auftragpuffer auf 50 µl aufgefüllt. Der so erhaltene Standard hatte in den meisten Fällen eine Aktivität von 50000 - 100000 cpm / µl und wurde bei - 20 °C gelagert. Auf die Gele wurden wahlweise je nach Aktivität der Proben 1 - 3 µl des Standards aufgetragen, so daß bei entsprechender Expositionszeit des Röntgenfilmes eine deutliche Hydrolyseleiter zu sehen war.

### **2.3.2.4 Denaturierende Gradienten – Gelelektrophorese (DGGE)**

#### **2.3.2.4.1 Analytische DGGE**

##### **2.3.2.4.1.1 Beschreibung der Methodik**

Mit Hilfe von Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) können einzelne Basenänderungen in DNA - Segmenten nachgewiesen werden. Das Separationsprinzip der Technik nutzt das unterschiedliche Schmelzverhalten von doppelsträngigen DNA - Fragmenten aus, welche in ihrer Sequenz, mit Ausnahme weniger Basenaustausche, identisch sind. Das Schmelzverhalten kann die Mobilität eines DNA – Fragmentes verändern, das durch ein Polyacrylamidgel mit einem Gradienten denaturierender Agenzien wandert. In einem Polyacrylamid – Gel mit einem denaturierenden Gradienten werden die DNA - Fragmente, solange sie noch nicht denaturiert sind, d.h. die Doppelhelix vollkommen intakt ist, nach ihrer Größe aufgetrennt. Wenn die DNA – Fragmente zu denaturieren beginnen, öffnen sie sich zunächst in einem Abschnitt niedriger Schmelztemperatur, während sie von noch nicht geschmolzenen DNA – Abschnitten höherer Schmelztemperatur zusammengehalten („geklammert“) werden. An diesem Punkt verlangsamt sich die Schmelzrate. Nach vollständiger Denaturierung der DNA – Fragmente werden die nunmehr einzelsträngigen DNA – Fragmente (single stranded, ssDNA) wieder nach ihrer Größe aufgetrennt.

16S rRNA – Genabschnitte können mittels DGGE untersucht werden, indem bestimmte Abschnitte des Genes mittels PCR amplifiziert werden. Um eine vollständige Denaturierung der DNA – Fragmente im denaturierenden Gradienten zu verhindern, wird einem der beiden in der PCR eingesetzten Primer an dessen 5‘ – Ende ein GC- reicher Abschnitt angefügt. Dieser GC – reiche Abschnitt wird bei der PCR – Amplifikation bei der Synthese des

Gegenstrangs ebenfalls transkribiert und so kommt es zur Ausbildung einer künstlichen, GC – reichen DNA – Domäne im zu amplifizierenden Fragment, welche eine sehr hohe Schmelztemperatur besitzt und eine langanhaltende Phase der verlangsamten Migration im denaturierenden Gradienten - Gel gewährleistet.

Zwei Arten denaturierender Gradientengel – Elektrophorese wurden im Rahmen dieser Untersuchung eingesetzt: rechtwinkelige (perpendicular) und parallele DGGE. Die Nomenklatur bezieht sich auf die Orientierung des an das Gel angelegten elektrischen Feldes in Bezug auf den Verlauf des denaturierenden Gradienten.

In der rechtwinkligen (perpendicular) DGGE verläuft der chemische Gradient von der linken zur rechten Seite des Geles, rechtwinkelig zum angelegten elektrischen Feld. Der chemische Gradient ist sehr groß (in dieser Untersuchung 20 % bis 70 % denat.) und dient der Bestimmung des Schmelzverhaltens der aufzutrennenden DNA – Fragmente. DNA – Fragmente im niedrig denaturierenden Bereich schmelzen nicht, werden somit nur proportional zu ihrer Größe durch das Gel wandern (da die PCR – Fragmente nahezu gleich groß sind, erfahren sie somit faktisch keine Separation) und wandern deswegen schnell durch das Gel. Im hoch denaturierenden Bereich dagegen denaturieren die Fragmente nahezu sofort partiell, verlieren ihre Mobilität und wandern im Gel nur wenig. Dazwischen liegt der Bereich, in dem die einzelnen Fragmente beginnen, partiell aufzuschmelzen. Man erkennt anhand von Linien, die vom unteren zum oberen Ende des Geles ziehen, welche Fragmente bei welcher Konzentration denaturierender Agenzien aufschmelzen. Für die Analyse durch parallele DGGE wird der Bereich denaturierender Agenzien ausgewählt, in dem alle zu untersuchenden DNA Fragmente aufschmelzen.

In der parallelen DGGE liegt der chemische Gradient parallel zum elektrischen Feld. DNA - Fragmente wandern durch das Gel, bis sie im mit der Wanderungsstrecke zunehmenden chemischen Gradienten an einer Stelle partiell aufschmelzen und im Gel „steckenbleiben“. Der chemische Gradient in parallelen Gelen ist schmaler, um eine bessere Auftrennung der Fragmente zu gewährleisten. Im Unterschied zur rechtwinkligen DGGE, bei der je Gradient nur eine einzige Probe untersucht werden kann, können bei der parallelen DGGE mehrere Proben nebeneinander laufen und deren Bandenmuster somit verglichen werden.

### 2.3.2.4.1.2 Verwendete Primer

Zur PCR – Amplifikation bzw. Sequenzierung von 16S rRNA – Genfragmenten wurden folgende Primer eingesetzt:

Name des Primers	Sequenz des Primers	eingesetzt zur
16-F-357	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	PCR, SEQ
16-F-530a	5'-TTC GTG CCA GCA GCC GCG G-3'	SEQ
16-R-518	5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	SEQ
GC-16-F-357	5'-(CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) – ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'	PCR
16-R-907	5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'	SEQ
GC-16-F-U968	5'-(CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) – AAC GCG AAG AAC CTT AC – 3'	PCR
16-R-L1401	5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'	PCR

Tabelle 8: Primer, die bei PCR und Sequenzierung von 16S rRNA – Genfragmenten zur Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Abkürzungen: PCR, zur PCR – Amplifikation eingesetzt; SEQ, zur Sequenzierung des Fragmentes eingesetzt. Weitere verwendete Primer können Tabelle 7 entnommen werden.

Die verwendeten Primer mit GC – Klammern entstammen folgenden Quellen: GC-16-F357 (Muyzer *et al.*, 1995); GC-16-F-U968 (Felske *et al.*, 1997); (Engelen *et al.*, 1998)

### 2.3.2.4.1.3 Vorbereitung der DNA - Proben zur PCR – Amplifikation

Von der in Abschnitt 2.3.2.1.2 hergestellten DNA – Fällung mit einem Volumen von 1140 µl (entsprechend ca. 3 l Meerwasser – Probe) wurden 95 µl (entsprechend ca. 250 µl Meerwasserprobe) entnommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. DNA wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 20000x g und 4°C pelletiert, zur Entfernung von Salzresten zweimal mit je 1 ml eiskaltem Ethanol 70 % [v/v] gewaschen, in einer SpeedVac (Savant) getrocknet und in 25 µl TE – Puffer pH 8,0 resuspendiert. 1 µl dieser Suspension enthielt in etwa die aus 10 ml Wasserprobe oder ca. 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Zellen extrahierte DNA – Menge.

### 2.3.2.4.1.4 PCR-Amplifikation der 16 S rRNA Gene aus Umwelt-DNA

#### Primerpaar GC-16-F-357 und 16-R-907

16S rRNA – Genfragmente wurden mit dem Primerpaar GC-16-F-357 und 16-R-907 aus Umwelt – DNA amplifiziert. Die eingesetzte Umwelt – DNA, enthalten in 1 µl DNA – Lösung entsprach, wie in 2.3.2.4.1.3 dargestellt, der extrahierbaren DNA – Menge von ca.  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen. In 100 µl PCR – Reaktionsgefäße wurden folgende Komponenten pipettiert:

dNTPs (Pharmacia) .....	800 µM je Nucleotid
MgCl <sub>2</sub> .....	1,5 mM
PCR – Puffer 10x (siehe 2.3.1.2.1.3).....	10 µl
Forward Primer.....	600 nM
Reverse Primer .....	600 nM
Taq - Polymerase (Perkin Elmer).....	2,5 U
Template.....	1 µl
MilliQ Wasser autoklaviert .....	ad 100 µl

Die PCR – Amplifikation erfolgte mittels einer Touchdown – PCR, bei der die Annealing – Temperatur zyklusweise erniedrigt wird. Bei dieser Vorgehensweise wurde in den empfindlichen ersten PCR – Schritten, in denen sich auftretende Fehler im weiteren PCR – Verlauf überproportional verstärken, die Spezifität der Primerbindung an die Template - DNA erhöht. Durch fortlaufende Herabsetzung der Annealing - Temperatur wurde in den späteren, nicht mehr so stark fehleranfälligen PCR – Schritten eine ausreichende Amplifikationsrate gewährleistet. Die Amplifikation wurde, modifiziert nach (Muyzer *et al.*, 1995), in einem Perkin Elmer Gene Amp 9600 wie folgt durchgeführt:

	5 min.....	95 °C	einleitende Denaturierung
	10 min.....	80 °C	<u>Zupipettieren Taq Polymerase</u>
19 Zyklen Touchdown – PCR, $\Delta T = \downarrow 0,5$ °C / Annealing je Zyklus			
	60 sec.....	95 °C	Denaturierung
	60 sec.....	65 – 55,5 °C	Annealing
	240 sec.....	72 °C	<u>Elongation</u>
11 Zyklen			
	60 sec.....	95 °C	Denaturierung
	60 sec.....	55,0 °C	Annealing
	240 sec.....	72 °C	<u>Elongation</u>
	10 min.....	72 °C	terminale Elongation

Zur Kontrolle wurden 3 µl des PCR – Produktes auf einem Agarose – Gel analysiert, wie unter 2.3.1.2.1.4 beschrieben.

### Primerpaar GC-16-F-U968 und 16-R-L1401

Zur Kalibrierung der kombinierten DNA – RNA Extraktion (siehe Abschnitt 2.3.2.1) wurden mit dem Primerpaar GC-16-F-U968 und 16-R-L1401 PCR – Amplifikationen und DGGE – Gelläufe ausgehend von Umwelt – DNA einer Teichwasserprobe durchgeführt. PCR – Ansätze wurden, nach (Engelen *et al.*, 1998) und (Heuer *et al.*, 1997), wie folgt zusammengefügt:

Tris – HCl [pH 8,3] .....	10 mM
KCl .....	10 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	3 mM
DMSO .....	5 % [v/v]
dNTPs (Pharmacia) .....	100 µm je Nucleotid
Forward Primer [10 µM] .....	20 pmol
Reverse Primer [10 µM] .....	20 pmol
Stoffel – Fragment .....	5 U
Template .....	5 µl
MilliQ Wasser autoklaviert .....	ad 50 µl

Eingesetztes Stoffel – Fragment wurde von Perkin Elmer bezogen (Ampli – Taq DNA – Polymerase, Stoffel - Fragment, No. N808-0038). Die PCR – Amplifikation wurde in einem Perkin Elmer 9600 Gene Amp wie folgt durchgeführt:

	7 min .....	94 °C	einleitende Denaturierung
35 Zyklen	60 sec .....	94 °C	Denaturierung
	60 sec .....	54 °C	Annealing
	60 sec .....	72 °C	Elongation
	10 min .....	72 °C	terminale Elongation

Zur Kontrolle wurden 3 µl des PCR – Produktes auf einem Agarose – Gel analysiert, wie unter 2.3.1.2.1.4 beschrieben.

#### 2.3.2.4.1.5 Reverse Transcriptase – PCR (RT - PCR)

Zur Kalibrierung der kombinierten DNA – RNA Extraktion (siehe Abschnitt 2.3.2.1) wurden RT - PCR – Amplifikationen und DGGE – Gelläufe ausgehend von Umwelt – DNA einer Teichwasserprobe durchgeführt. Zunächst wurde ein Aliquot einer Umwelt – RNA Probe mit RNase freier DNase behandelt, um jegliche DNA aus dem Ansatz zu entfernen. Nach Inaktivierung der RNase freien DNase wurde die RNA mit Random – Hexamer – Primern und Reverser Transcriptase in RT – DNA überschrieben. RT – DNA wurde dann als Ausgangsmaterial zur PCR – Reaktion mit den Primerpaaren (GC-16-F-357 und 16-R-907) bzw. (GC-16-F-U968 und 16-R-L1401) eingesetzt.

## DNase – Verdau

### Lösungen

#### DNase – Puffer, 10fach

Natrium – Acetat .....	1 M
MgSO <sub>4</sub> , pH 5 .....	50 mM

### Durchführung

Die aus 625 ml Teichwasserprobe extrahierbare RNA – Menge, aufgenommen in 5 µl RNase freiem, autoklavierten MilliQ - Wasser wurde mit 10 µl 10fach DNase – Puffer, 1 µl RNase freier DNase [10 U/µl ] (Boehringer 776 785) und 90 µl RNase freiem, autoklaviertem MilliQ – Wasser für 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde mit einem gleichen Volumen Phenol, mit Puffer auf pH 8,0 equilibriert und zur Entfernung der RNase freien DNase eine Phenol - Chloroform – Extraktion durchgeführt, wie in (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben. Der wäßrige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Vol. 3M Natrium – Acetat und 3 Vol. Ethanol p.A. vermischt und über Nacht bei – 70 °C ausgefällt. Die RNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 18 200x g und 4 °C ausgefällt, mit 75 % eiskaltem Ethanol gewaschen, in einer SpeedVac (Savant) getrocknet und in 30 µl RNase freiem, autoklaviertem MilliQ – Wasser aufgenommen. Eventuell verbliebene DNase wurde durch 10 minütige Inkubation bei 70 °C in einem Thermocycler (Landgraf) inaktiviert.

## RT – PCR

Von der in Abschnitt 2.3.2.1.2 erstellten RNA – Lösung wurden 5 µl entnommen und in die RT – PCR Reaktion eingesetzt. In einem 100 µl PCR – Reaktionsgefäß wurden die folgenden Komponenten zusammenpipettiert:

Hexanucleotide [Random] .....	1 µl / 20 µg
PCR – Puffer [siehe 2.3.1.2.1.3] .....	2 µl
DTT .....	10 mM
dNTPs .....	2 mM
MilliQ Wasser steril, RNase frei .....	ad 19 µl
2 min bei 37 °C inkubieren, dann zufügen:	
Reverse Transcriptase .....	1 µl (= 200 U)

Als Reverse Transcriptase wurde Superscript RT (Gibco BRL, No. 18053-017) eingesetzt. Hexanucleotide stammen von Boehringer Mannheim (No. 1034731). Die RT – Reaktion wurde für 2 h bei 37 °C in einem Perkin Elmer 9600 Gene Amp durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 3 µl des unverdünnten RT - PCR – Produktes auf einem Agarose – Gel analysiert, wie unter 2.3.1.2.1.4 beschrieben. Die verbleibende cDNA wurde 1:1000 in autoklaviertem, RNase freiem MilliQ – Wasser verdünnt und je 1 µl dieser verdünnten Lösung in die PCR – Reaktion eingesetzt.

## PCR von cDNA

1,5 µl der 1:1000 verdünnten cDNA wurde in die PCR – Reaktion eingesetzt. Die PCR – Reaktionen wurden durchgeführt, wie in den Abschnitten 2.3.1.2.1.3 und 2.3.2.4.1.4 beschrieben

### 2.3.2.4.1.6 Vorbereitung der PCR – Proben zur DGGE

Je 97 µl des PCR – Produktes wurden mit 1/10 Vol 3 M Natrium – Acetat und 3 Volumen Ethanol p.A. vermischt, über Nacht bei 4 °C ausgefällt (zur Vermeidung der Bildung von DNA – scherenden Eiskristallen), durch Zentrifugation für 20 min bei 18200x g und 4 °C pelletiert, in einer SpeedVac getrocknet und für 45 min unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur in 10 µl Auftragspuffer (siehe 2.3.1.1.2.5) resuspendiert.

### 2.3.2.4.1.7 Erstellen von Gelen zur DGGE

#### Definitionen

DGGE - Polyacrylamid – Gele werden im Folgenden in Bezug auf drei Eigenschaften charakterisiert (wobei Crosslinker in dieser Untersuchung synonym für N,N' – Methylenbisacrylamid (BIS) und N,N' – Bis(acryloyl)cystamin (BAC) steht):

1) Die totale Monomer – Konzentration (%T):

$$\%T = \frac{\text{Gramm Acrylamid} + \text{Gramm Crosslinker}}{\text{Gesamtes Volumen}}$$

2) Die Konzentration an Crosslinker – Monomeren (%C):

$$\%C = \frac{\text{Gramm Crosslinker}}{\text{Gramm Acrylamid} + \text{Gramm Crosslinker}}$$

3) Die Konzentration an denaturierenden Agenzien, wobei gilt:

Eine 100 % denaturierende Lösung entspricht einer Konzentration von 40 % [v/v] Formamid und 42 % [w/v] Harnstoff, eine 0 % denaturierende Lösung enthält weder Formamid noch Harnstoff. Das Konzentrationsmaß ist linear.

#### Lösungen

40 % [w/v] Acrylamid / Bis (37,5:1)

Acrylamid.....38,0 g  
Bis – Acrylamid.....2,0 g  
dest. H<sub>2</sub>O .....ad 100 ml  
sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

TAE – Puffer (50 fach)

TAE – Puffer 50x .....(siehe 2.3.1.2.1.4)



*Denaturierende Acrylamid – Lösungen (für 6 %T PAA – Gele)*

40 % Acrylamid / Bis (37,5:1) .....15 ml  
 TAE – Puffer 50x (siehe 2.3.1.2.1.4). 2,0 ml  
 MilliQ Wasser .....ad 100 ml  
 Formamid (Fluka R04908) .....siehe Tabelle 9  
 Harnstoff.....siehe Tabelle 9

Lösungen wurden durch Sterilfiltration entgast und bei 4 °C aufbewahrt  
 Unmittelbar vor der Polymerisation zugeben:

APS.....0,09 % [v/v] Endkonz.  
 TEMED .....0,09 % [v/v] Endkonz.

% denaturierend	0 %	20 %	30 %	40 %	50 %	70 %	100 %
Formamid [ml]	0	8	12	16	20	28	40
Harnstoff [g]	0	8,4	12,6	16,8	21	29,4	42

Tabelle 9: Eingesetzte Mengen an Formamid und Harnstoff in Acrylamid Lösungen zur Erstellung von 100 ml Polyacrylamid / Bis DGGE – Gellösung.

*APS (Ammoniumpersulfat) 10 % [w/v]**Farbstofflösung*

Bromphenolblau (Sigma B 7021) ..0,5 % [w/v]  
 Xylen–Cyanol (BioRad 161-0423).0,5 % [w/v]  
 TAE – Puffer 1x (siehe 2.3.1.2.1.4). 10,0 ml

**Durchführung**

DGGE – Gelelektrophoresen wurden mit einem D Gene Denaturing Gel Electrophoresis System (BioRad, Hercules, CA, USA, Nr. 170-9062) durchgeführt. Rechtwinkelige (perpendicular) und parallele DGGE – Gele wurden nach Anleitung des Herstellers vorbereitet und gegossen. Der denaturierende Gradient wurde mit einem Gradient Delivery System Model 475 (BioRad Nr. 170-942) erzeugt.

**2.3.2.4.1.7.1.1      Rechtwinkelige (perpendicular) DGGE - Gele**

Für 1 mm starke rechtwinkelige DGGE – Gele wurde eine Trägerglasplatte mit verdünntem Bind – Silane (siehe 2.3.1.1.2.2) und eine Glasplatte mit Repel - Silane imprägniert. Anschließend wurden beide Glasplatten mit Ethanol 70 % [v/v] poliert, nach Anleitung des Herstellers zusammengebaut und eine Hälfte des Zwischenraumes dieser 10 cm langen Glasplatten (D Gene Converter Kit to 10 cm, BioRad Nr. 170-9007) mit einem Spacer auf ein Maß von 7,5 x 10 cm abgetrennt. Die Laufstrecke des Geles, abzüglich des Kammes einer Länge von 1 cm, betrug 9 cm. Die Apparatur wurde mit einem präparativen einzähnigen Gelkamm und einem speziellen Kammhalter befestigt, abgedichtet und mit Hilfe eines Statives seitlich aufgestellt. Je 5 ml der niedrigen und hoch denaturierenden Acrylamid – Bis Lösung (6 %T) wurden auf 4 °C temperiert, entgast, mit APS und TEMED versetzt und in zwei Einwegspritzen eingefüllt (wobei die hoch denaturierende Lösung mit 100 µl Farbstofflösung versetzt war, um die Qualität des Gradienten optisch kontrollieren zu

können). Die Einwegspritzen wurden in das Gradient Delivery System eingespannt, mit Schläuchen mit dem zusammengebauten Gel verbunden und je 4,5 ml der hoch und der niedrig denaturierenden Lösung in den Glaszwischenraum gepumpt. Der Gradient wurde vom Boden des Glaszwischenraumes befüllt (bottom filling), d.h. der Anteil der niedrig denaturierenden Lösung wurde zuerst in die Apparatur gepumpt. Das Gel polymerisierte für zwei Stunden bei Raumtemperatur, bevor es aus der Gießvorrichtung aus – und in die Elektrophoreseapparatur eingebaut wurde.

#### **2.3.2.4.1.7.1.2      *Parallele DGGE – Gele***

Parallele DGGE – Gele wurden mit 16 cm x 16 cm großen Glasplatten gegossen. Die Trennstrecke dieser Gele betrug etwa 14 cm, abzüglich eines 1 cm langen Kammes und einer 1 cm dicken 0 % denaturierenden PAA - Sammelgelschicht. Die Glasplatten wurden mit Ethanol 70 % [v/v] gereinigt. Auf die Trägerglasplatte wurde eine passend zurechtgeschnittene Trägerfolie (Serva) aufgebracht und leicht angedrückt, bis Newtonsche Beugungsringe sichtbar wurden. Die gegenüberliegende Glasplatte wurde mit Repel – Silane eingerieben und mit Ethanol 70 % [v/v] poliert. Beide Glasplatten, durch 1 mm dicke Spacer voneinander separiert, wurden nach Anleitung des Herstellers zusammengebaut. Je 14 ml der niedrigen und hoch denaturierenden Acrylamid – Bis - Lösung (6 %T) wurden auf 4 °C temperiert, entgast, mit APS und TEMED versetzt und in zwei Einwegspritzen eingefüllt (wiederum war die hoch denaturierende Lösung mit 100 µl Farbstofflösung versetzt, siehe 2.3.2.4.1.7.1.1). Mit Hilfe des Gradient Delivery Systems wurden je 13 ml der hoch und der niedrig denaturierenden Lösung von oben (top filling) in den Gelzwischenraum gepumpt. Der Gelzwischenraum wurde bis auf eine Höhe von zwei cm unter dem Ende der Glasplatte befüllt. Anschließend wurde vorsichtig 1 ml MilliQ Wasser über den Gradienten pipettiert, um eine gerade Oberkante des Gradientengeles zu erhalten. Nach zweistündiger Polymerisation bei Raumtemperatur wurde das MilliQ Wasser von dem erstarrten Gel entfernt und das Gel bis zum oberen Rand der Glasplatte mit 0 % denaturierender PAA - Sammelgelschicht (6 %T) überschichtet. In die Sammelgelschicht wurde ein 16-zähliger oder ein 36-zähliger Kamm (je 1 mm Stärke) eingeschoben. Das Gel polymerisierte anschließend für mindestens zwei Stunden.

#### **2.3.2.4.1.8      *Elektrophoresebedingungen***

DGGE – Gele wurden in eine Haltevorrichtung mit integrierten Elektroden des D-Gene Denaturing Gel Electrophoresis Systems eingebaut und diese Haltevorrichtung in den Puffertank, gefüllt mit 7 Liter 0,5 fachem TAE – Puffer, eingebaut. Diese Apparatur wurde mit Hilfe einer eingebauten Heizung und einer eingebauten Umwälzpumpe auf eine Temperatur von 60 °C aufgeheizt. Während des Heizvorgangs wurden nicht eingebaute Monomere durch Elektrophorese bei 50 V und 0,01 mA entfernt. Als Netzteil wurde ein Power Supply Model 200/2.0 (BioRad) verwendet. Nachdem die Temperatur im Inneren der Pufferkammer 60 °C erreicht hatte, wurden die Gele beladen, indem zunächst die Geltaschen mit Hilfe einer Einwegspritze mit Puffer gespült wurden und dann das resuspendierte PCR –

Produkt (siehe 2.3.2.4.1.6) vollständig in die Geltaschen pipettiert wurde. Die Stromspannung wurde zunächst, während der Migration der PCR – Produkte durch den zu 0 % denaturierenden Sammelgelabschnitt, auf 100 V festgesetzt und nach erfolgtem Übertritt in das Gradientengel auf 200 V und eine daraus resultierende Stromstärke von 10 bis 11 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde fortgesetzt, bis der Xylen – Cyanol Marker aus dem Gel ausgelaufen war. Danach wurde das auf der Trägerfolie anhaftende Gel zunächst mit SYBR – Gold und anschließend mit Silbernitrat gefärbt.

#### **2.3.2.4.1.9 Färbung der analytischen Gele**

##### **Färbung der Gele mit SYBR – Gold**

DGGE - Gele wurden zunächst mit SYBR – Gold gefärbt. Der Farbstoff wurde in 125 ml Ethanol 20 % [v/v] gelöst. Das Gel wurde zunächst für 10 min mit 125 ml Ethanol 20 % [v/v] gewaschen und anschließend mit der ethanolischen Färbelösung über Nacht in einer Plastikwanne unter langsamen Schwenken inkubiert. Das Ethanol in der Färbelösung diente dabei zur Fixierung des Geles. Die Detektion der Gelbanden erfolgte an einem Fluorimeter (Fluor-S Multiimager, BioRad), welches an einen PC angeschlossen war. Aufnahmen der Gele konnten in digitaler Form im TIFF – Format gespeichert werden. Nach erfolgter Dokumentation wurden die Gele durch mindestens dreimaliges Waschen mit 125 ml Ethanol 20 % [v/v] während einer Zeitspanne von 24 h entfärbt. Die entfärbten Gele konnten mit Silbernitrat angefärbt werden, ohne daß ein erhöhter Hintergrund auftrat.

##### **Färbung der Gele durch Silberfärbung**

Nach der SYBR – Gold Entfärbung wurden die Gele mit Silbernitrat gefärbt. Die Färbung wurde mit dem PlusOne Silver Staining Kit (No. 80-6343-34) der Firma Pharmacia nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Pharmacia, ). Silbergefärbte Gele wurden mit Cellophanpapier bedeckt, getrocknet und anschließend mit einem computergesteuerten Densitometer (GS-400, BioRad) bei einer Auflösung von 300 dpi (dots per inch) eingescannt und im TIFF – Format gespeichert.

#### **2.3.2.4.1.10 Computergestützte Auswertung der DGGE-Profile**

Digitale Bilder der DGGE – Gele im TIFF – Format wurden mit den Programmpaketen GelCompar, Version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) und RFLPScan Version 3.0 (Scanalytics, USA) ausgewertet. Diese Programmpakete wurden ausführlich in Abschnitt 2.3.1.1.3 vorgestellt. Im Unterschied zur Auswertung der LMW – RNA Profile wurden bei der Analyse der DGGE – Gele nur die Positionen der Banden, nicht aber deren Stärke verglichen. DGGE - Banden wurden in der Auswertung nicht gewichtet, d.h. alle Banden besaßen die selbe Priorität.

## 2.3.2.4.2 DGGE zum Ausschneiden von Gelbanden

### 2.3.2.4.2.1 Beschreibung der Methodik

Herkömmliche PAA – BIS Gele erlauben eine Elution von Nucleinsäuren einer Länge von bis zu ca. 450 Basenpaaren (Muyzer *et al.*, 1995). Die Elution größerer Nucleinsäure - Fragmente aus diesen Gelen ist nur mit Hilfe einer relativ aufwendigen Elektroelution möglich. Eine Möglichkeit, größere Nucleinsäurefragmente aus Polyacrylamidgelen zu eluieren, besteht darin, den Crosslinker N,N' – Bis(acryloyl)cystamin (BAC) an Stelle von N,N' - Methylbisacrylamid einzusetzen (Hansen, 1976), (Righetti, 1983), (Chiari & Righetti, 1995). Die Vernetzung der Monomere durch BAC erfolgt über Disulfid – Brücken, welche mit Thiolen aufgespalten werden können. Auf diese Weise ist es möglich, nach der Elektrophorese eine engmaschige Gelmatrix zu verflüssigen und großporig zu machen und damit eine Diffusion auch größerer Nucleinsäurefragmente aus der Gelmatrix heraus zu ermöglichen.

### 2.3.2.4.2.2 Erstellen von BAC-Gelen

#### Lösungen

##### *Denaturierende Acrylamid – BAC (20:1) – Lösungen (für 6 %T PAA – Gele)*

Acrylamid.....	5,7 g
N,N' – Bis(acryloyl)cystamin .....	0,3 g
TAE – Puffer 50x (siehe 2.3.1.2.1.4).	2,0 ml
MilliQ Wasser .....	ad 100 ml
Formamid (Fluka R04908) .....	siehe Tabelle 9
Harnstoff.....	siehe Tabelle 9

Lösungen wurden durch Sterilfiltration entgast und bei 4 °C aufbewahrt

Unmittelbar vor der Polymerisation zugeben:

APS.....	0,02 % [v/v] Endkonz.
TEMED .....	1 % [v/v] Endkonz.

Die eingesetzten Konzentrationen an Formamid und Harnstoff können Tabelle 9, Seite 53 entnommen werden.

N,N' – Bis(acryloyl)cystamin wurde von BioRad (Nr. 161-0204) bezogen. Rezepte für weitere verwendete Lösungen finden sich in Abschnitt 2.3.2.4.1.7.

#### Durchführung

6 %T Acrylamid - N,N' – Bis(acryloyl)cystamin – Gele wurden vorbereitet und gehandhabt, wie es für PAA – BIS – Gele in Absätzen 2.3.2.4.1.7.1.2 (Gelvorbereitung) 2.3.2.4.1.8 (Elektrophorese) und 2.3.2.4.2.3 (SYBR – Gold Färbung) beschrieben wurde. Ein kritischer Parameter bei der Herstellung der PAA – BAC Gele ist die APS – Konzentration der denaturierenden Acrylamid – BAC Lösungen: Ist sie zu hoch, können ausgeschnittene Gelstücke nur ungenügend solubilisiert werden, ist sie zu niedrig, polymerisiert das Gel nicht vollständig – resultierend in einem flüssigen oder schlecht auftrennenden Gel. Um eine vollständige Polymerisation des Gels trotz niedriger APS – Konzentration zu erreichen, muß

die TEMED – Konzentration stark erhöht werden. Als Folge des sehr hohen TEMED – Anteiles polymerisiert die oben beschriebene Lösung rasch, was zu Schwierigkeiten beim Gießen des Geles führen kann (z.B. in Schläuchen polymerisierendes Acrylamid). Gute Ergebnisse in einer weniger rasch polymerisierenden Lösung wurden beim Einsatz von 13 ml je denaturierender Lösung, versetzt mit je 90 µl TEMED (Endkonz. 0,7 % statt 1 % bzw. 130 µl) und je 40 µl APS 10 % [w/v] (Endkonz. 0,03 % statt 0,02 % bzw. 26 µl) erzielt. Einer zu raschen Polymerisation der Gellösungen wurde außerdem entgegengewirkt, indem PAA – BAC - DGGE – Gele bei 4 °C statt bei Raumtemperatur gegossen wurden. Die Polymerisation der Gele bei 4 °C über Nacht verlief vollständig. Vor Benutzung wurden die PAA – BAC Gele für zwei Stunden bei Raumtemperatur equilibriert.

#### **2.3.2.4.2.3 Färbung der präparativen Gele**

Die Färbung der PAA – BAC Gele erfolgte mit dem Farbstoff SYBR – Gold (Molecular Probes) und wurde in Abschnitt 2.3.2.4.2.3 dargestellt. Banden konnten in PAA - BAC - Gelen durch Silberfärbung nicht sichtbar gemacht werden, da möglicherweise die Disulfidbrücken des Crosslinkers die differentielle Silberreduktion der Silberfärbung inhibieren.

#### **2.3.2.4.2.4 Elution und Fällung von ausgeschnittenen DGGE – Banden**

##### **Lösungen**

###### *Mercaptoethanol – Fällungsmix*

Ethanol p.A.....	45 % [v/v]
β - Mercaptoethanol p.A.....	45 % [v/v]
Natrium – Acetat .....	200 mM
..... entspr. ~ 10 % [v/v] einer 2 M Stammlsg.	

Die Lösung wurde unmittelbar vor Verwendung frisch angesetzt.

##### **Durchführung**

Gelbanden wurden mit Hilfe von autoklavierten Pasteurpipetten und einem Peleus – Ball aus dem Gel ausgestochen und in ein Eppendorf – Reaktionsgefäß mit 300 µl sterilem TE – Puffer überführt. Die Elution und gleichzeitige Ausfällung der DNA erfolgte durch eine Mercaptoethanol – Fällung. In das Reaktionsgefäß mit dem Gelblock und den 300 µl TE - Puffer wurden 870 µl Mercaptoethanol – Fällungsmix pipettiert, gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde erneut gevortext und unmittelbar darauf mit einer autoklavierten 200 µl Eppendorf – Pipettenspitze die Flüssigkeit in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, so daß nicht solubilisierete Reste des Gelblockes im alten, zu verwerfenden Reaktionsgefäß verblieben. DNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 18200x g und 4 °C pelletiert, mindestens drei Mal mit eiskaltem Ethanol 70 % [v/v] gewaschen und in einer SpeedVac (Savant) getrocknet. Das eluierte Amplifikationsprodukt

wurde in 20 µl TE – Puffer pH 8,0 resuspendiert und für 45 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Suspension konnte für einige Wochen bei – 20 °C aufbewahrt werden.

#### **2.3.2.4.2.5 Reamplifikation eluierter DNA**

Eluiertes Amplifikationsprodukt (Eluat) wurde durch PCR mit den Primern GC-16-F-357 und 16-R-907 amplifiziert, wie in Absatz 2.3.2.4.1.4 beschrieben. Der Erfolg der PCR wurde durch Auftragen von 3 µl des Reamplikates auf ein Agarose – Gel kontrolliert. 17 µl des Reamplikates wurde zur Sequenzierung des 16rRNA – Genfragmentes verwendet und die restlichen 80 µl in die Kontroll – DGGE zum Vergleich des Reamplikates gegen die entsprechende Umweltprobe eingesetzt.

#### **2.3.2.4.2.6 Kontroll - DGGE der PCR-Produkte gegen Umweltproben**

Reamplifizierte DGGE – Banden wurden ausgefällt und in Auftragspuffer resuspendiert (wie in 2.3.2.4.1.6 dargestellt) und auf einem DGGE – Gel (siehe Abschnitte 2.3.2.4.1.7.1.2, 2.3.2.4.1.8) zum Vergleich neben der betreffenden amplifizierten Umweltprobe aufgetragen, aus der die jeweilige reamplifizierte Bande ursprünglich ausgeschnitten wurde. Mit dieser Kontroll - DGGE sollte überprüft werden, welche Bande aus der Umweltprobe tatsächlich reamplifiziert worden war.

#### **2.3.2.4.2.7 Sequenzierung ausgeschnittener, reamplifizierter Gelbanden**

17 µl des Reamplikates wurde in Microcon – Zentrifugenfiltern aufgereinigt, wie in Abschnitt 2.3.1.2.1.5 beschrieben, das Volumen des Retentates mit autoklaviertem MilliQ Wasser auf 20 µl eingestellt und sequenziert, wie in Abschnitt 2.3.1.2.1.6 beschrieben. Eine Liste der zur Sequenzierung eingesetzten Primer findet sich in Abschnitt 2.3.2.4.1.2 . Die Sequenzen der 16S rRNA – Genfragmente wurden ausgewertet, wie in 2.3.1.2.1.7 beschrieben.

### **2.3.3 SSCP – Analysen**

PCR - Amplifikationen partieller 16S rRNA Gene aus DNA - Lysaten von Bakterien - Reinkulturen und Umweltnucleinsäureextrakten wurden durchgeführt wie von Schwieger und Tebbe (1998) beschrieben. Je 1 µl eines bakteriellen Zellysates bzw. extrahierter, ausgefallter und resuspendierter Umwelt - DNA (entsprechend der in 140 bzw. 180 ml Wasserprobe enthaltenen extrahierbaren DNA) wurden mit dem nicht phosphorylierten Primer 16-F-530a und dem phosphorylierten Primer 16-R-907 zu den in Abschnitt 2.3.1.2.1.3 beschriebenen

Reaktionsansätzen zusammenpipettiert. Die PCR - Amplifikation wurde folgendermaßen durchgeführt:

	5 min.....	95 °C	einleitende Denaturierung
35 Zyklen	60 sec.....	95 °C	Denaturierung
	60 sec.....	52 °C	Annealing
	60 sec.....	72 °C	Elongation
	10 min.....	72 °C	terminale Elongation

PCR-Produkte wurden durch Aufreinigung mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden, Nr. 28104) gemäß Angaben des Herstellers von überschüssigen Primern, Nucleotiden und Reagenzien separiert. Der phosphorylierte Strang des doppelsträngigen PCR - Produktes wurde mit  $\lambda$  - Exonuclease [New England Biolabs (NEB), Schwalbach, # 262L, 5 U/ $\mu$ l] wie folgt verdaut:

	Bakterielle Lysate	Umwelt- proben
DNA (PCR-Prod.) .....	3 $\mu$ l	15 $\mu$ l
Exonuclease ( $\lambda$ ) [NEB #262L, 5U/ $\mu$ l] .....	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l
10fach Puffer [NEB].....	1,25 $\mu$ l	4 $\mu$ l
MilliQ Wasser autoklaviert .....	ad 12,5 $\mu$ l	ad 40 $\mu$ l
1,5 h Inkubation bei 37 °C		

Die Reaktion wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens Fällungsmix (siehe Abschnitt 2.3.1.1.1.1) gestoppt. Einzelsträngige DNA wurde durch Inkubation bei -20°C über Nacht ausgefällt, am darauffolgenden Tag für 15 Minuten bei 20 000x g und 4° C abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und das Pellet getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 4  $\mu$ l Auftragspuffer (Endkonzentrationen: 95 % [v/v] Formamid, 10 mM NaOH, 0,025 % [w/v] Bromphenolblau, 0,025 % [w/v] Xylencyanol) aufgenommen, bei 95 °C denaturiert, kurz bei 4°C herunter zentrifugiert und auf ein SSCP - Gel aufgetragen.

#### Vorbereitung des SSCP - Gels

MDE - Lösung [2fach] [FMC Bio- Products, Rockland, Maine, USA, # 50620] .....	9 ml
TBE - Puffer [10 fach].....	3 ml
MilliQ Wasser .....	ad 30 $\mu$ l
für 3 min entgasen, dann Zugabe von	
APS [40 % [w/v]] .....	30 $\mu$ l
TEMED .....	12 $\mu$ l

SSCP - Gelläufe wurden auf Macrophor - Sequenziereinheiten durchgeführt. Die Gelvorbereitung verlief analog, wie in Abschnitt 2.3.1.1.2 für die Durchführung von LMW - RNA - Profilanalysen beschrieben, mit folgenden Unterschieden: Auf die Thermoplatte der Sequenziereinheit wurde als Trägerfolie eine GelBond - PAG - Folie [FMC BioProducts,

Rockland, Maine, USA, #54733] gemäß den Angaben des Herstellers so aufgebracht, daß die hydrophobe Seite zur Thermoplatte, die hydrophile Seite zum Gel wies. Die Länge des Gels betrug 43 cm, die Geldicke 0,4 mm. Der Gellauf wurde für 16 h bei einer Temperatur von 20 °C, einer Spannung von 400 V, einer Stromstärke von 8 mA und einer resultierenden Leistung von ca. 3 W aufgetrennt.

SSCP - Gele wurden nach der Methode von Bassam (1991) gefärbt. Gele wurden nach Trennung von der Kühlplatte zunächst für 30 Minuten in 600 ml 10 % [v/v] Essigsäure und anschließend drei Mal für je 5 Minuten in MilliQ - Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel in 500 ml Silbernitratlösung (0,5 g AgNO<sub>3</sub>, 0,75 ml Formaldehyd [37 % v/v, stabilisiert in 10 % [v/v] Methanol, Roth, Karlsruhe # 4979.1], ad 500 ml MilliQ - Wasser) gefärbt, für 30 Sekunden kurz in MilliQ Wasser gespült und anschließend in auf 4°C gekühlter Entwicklerlösung (37,75 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x 10 H<sub>2</sub>O, 0,6 ml Natriumthiosulfatlsg. [0,2 %], 1,2 ml Formaldehyd [37 % v/v, Roth, Karlsruhe # 4979.1], ad 600 ml MilliQ Wasser) bis zur gewünschten Durchfärbung entwickelt. Die Entwicklung wurde durch 30 minütige Inkubation in 10 % [v/v] Essigsäure gestoppt und anschließend das auf der Trägerfolie befindliche Gel mit Cellophanfolie bedeckt und getrocknet. Die Datenauswertung erfolgte, wie für DGGE-Gele in Abschnitt 2.3.2.4.1.10 beschrieben.



## 3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, abundante Organismen im Bakterioplankton des westlichen Mittelmeeres zu identifizieren. Die Untersuchung umfaßte einen Vergleich bakterieller Lebensgemeinschaften, die im freien Wasserkörper abundant waren mit Organismen, die Bestandteile des bakteriellen Aufwuchs mariner Partikel bildeten. Zu klären war, wie sich die bakteriellen Lebensgemeinschaften dieser beiden verschiedenen Habitate voneinander unterschieden. Das untersuchte Probenmaterial wurde Anfang April 1995 an zwei unterschiedlichen Standorten in der Nähe von Nizza / Frankreich entnommen, an der küstennahen Station S1 und an der küstenfernen Station S2. Partikelgebundene und freilebende Bakterienfraktionen wurden durch fraktionierte Filtration voneinander getrennt. Die Untersuchungen beinhalteten einerseits einen klassischen mikrobiologischen Ansatz über Kultivierung von Mikroorganismen auf Agarplatten sowie deren Charakterisierung. Andererseits sollten abundante aber unkultivierbare Organismen über molekularbiologische Untersuchungen anhand von Nucleinsäureextrakten erfaßt werden. Die Ergebnisse beider Ansätze wurden auf Übereinstimmungen und Unterschiede verglichen. Ein Übersichtsschema über den Arbeitsablauf vorliegender Untersuchung und die Reihenfolge vorgenommener Analyseschritte ist in Abbildung 3 dargestellt.

### 3.1 Untersuchung der Isolate

Die Untersuchung der taxonomischen Struktur mariner mikrobieller Lebensgemeinschaften mittels Kultivierung, Isolierung und Identifizierung wurde wie folgt durchgeführt:

- Aus größenfraktionierten und unfraktionierten Meerwasserproben wurde Probenmaterial entnommen und auf verschiedenen Medien ausplattiert.
- Die Anzahlen an Colony Forming Units (CFUs) wurden auf verschiedenen Medien bestimmt.
- Isolate verschiedener Stationen und Fraktionen wurden von nährstoffreichem Komplexmedium (Marine Broth, MB) und von synthetischem Mineralsalzmedium mit Methanol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle isoliert.
- In einer ersten Screeningprozedur wurden die Isolate nach der Ähnlichkeit ihrer LMW-RNA Profile in Operational Taxonomic Units (OTUs) eingeteilt.
- Vertreter der OTUs wurden durch Sequenzierung der 16S rRNA - Gene identifiziert.
- Isolate wurden anschließend in einem zweiten LMW-RNA Profil – Analyseschritt mit den Referenzstämmen verglichen, welche die größten Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer 16S rRNA – Gene besaßen.
- Eine computergestützte Datenbank mit LMW-RNA Profilen von 315 Organismen (227 Isolate und 88 Referenzstämmen) wurde erstellt.
- Exemplarisch wurden ausgewählte Taxa phänotypisch näher charakterisiert, um zu bestimmen, inwiefern Ähnlichkeiten der 16S rRNA – Gene und der LMW – RNA – Profile auf phänotypische bzw. physiologische Merkmale schließen lassen.

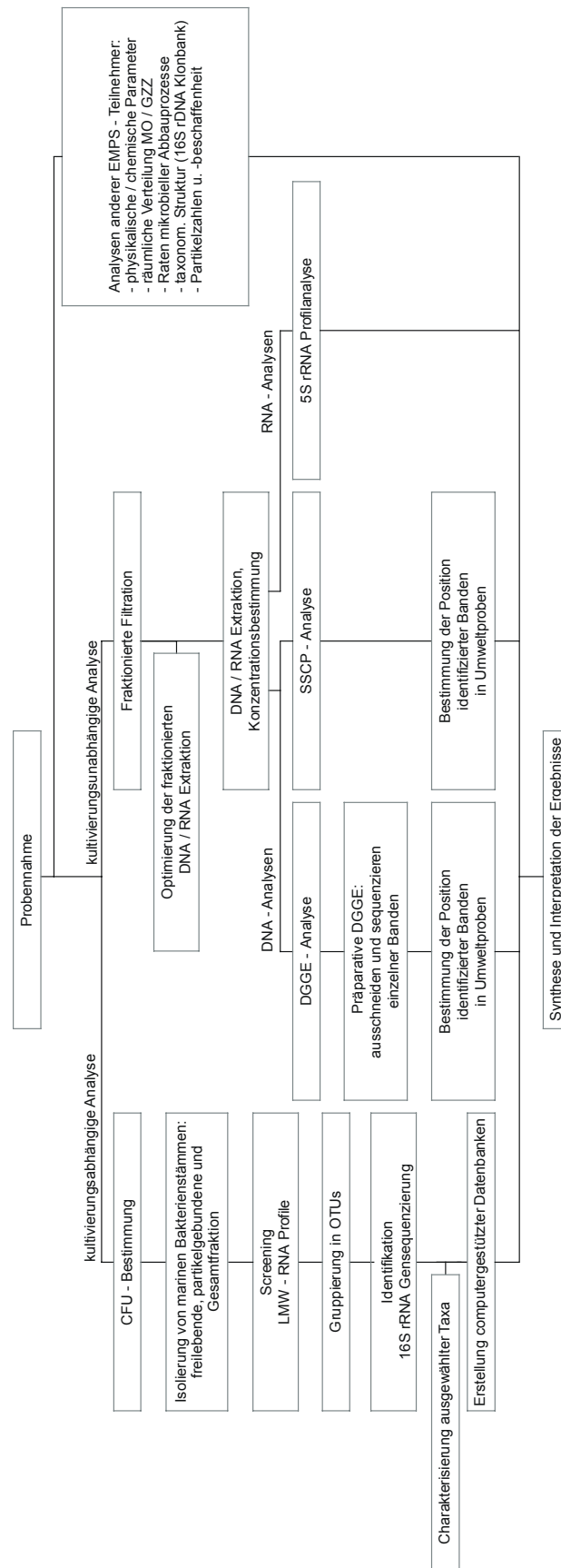


Abbildung 3 : Übersicht zu dem Arbeitsablauf vorliegender Untersuchung und die Reihenfolge vorgenommener Analyseschritte.

### 3.1.1 Bestimmung der Colony Forming Units

Meerwasserproben wurden durch sterile 1  $\mu\text{m}$  – Filter filtriert, um die freilebenden Bakterien als Fraktion (Filtrat, < 1  $\mu\text{m}$ ) von der partikelgebundenen Fraktion (Retentat, >1  $\mu\text{m}$ ) zu trennen. Filtrat und Retentat sowie unfiltrierte Meerwasserproben (Gesamtfraktion) wurden auf Marine Broth Agar zur Isolierung heterotropher Bakterien sowie auf Mineralsalzagar mit Methanol als einziger Energie – und Kohlenstoffquelle zur gezielten Anzucht methylotrropher Bakterien ausplattiert. Von diesen Agarplatten wurde dann die Anzahl der Colony forming units (CFUs), also aller auf Agarplatten lebensfähiger Bakterien bestimmt. Die Anzahl der CFUs wurde dann mit der Gesamtzahl der Zellen verglichen, die am Probennahmetag von der Arbeitsgruppe von Dr. C. Turley (Plymouth) mittels DAPI – Counts bestimmt wurden. Einzelheiten zu der verwendeten Methodik sind den Abschnitten 2.1 und 2.2 zu entnehmen.

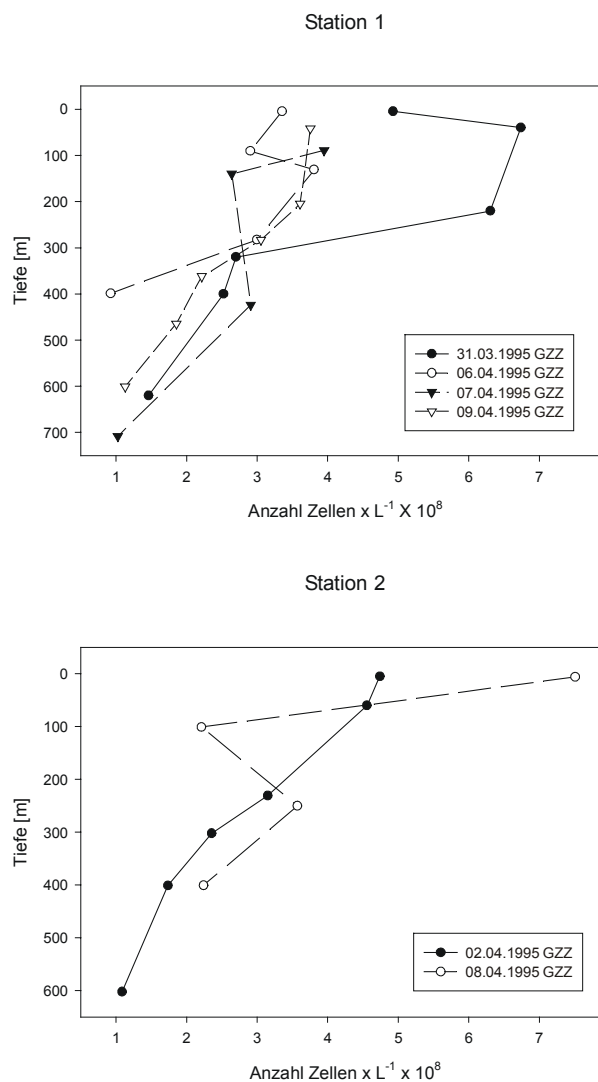


Abbildung 4: Gesamtzellzahlen nach Auszählung frischer Meerwasserproben mit DAPI. Abkürzung: GZZ, Gesamtzellzahl. Daten wurden im Rahmen des EMPS – Projektes erhoben von Dr. P. Harris und Dr. C. Turley (Plymouth Marine Laboratory, UK)

### 3.1.1.1 Oligotrophe Station S2

An der oligotrophen Station S2 verteilen sich die CFUs wie in Abbildung 5 dargestellt.

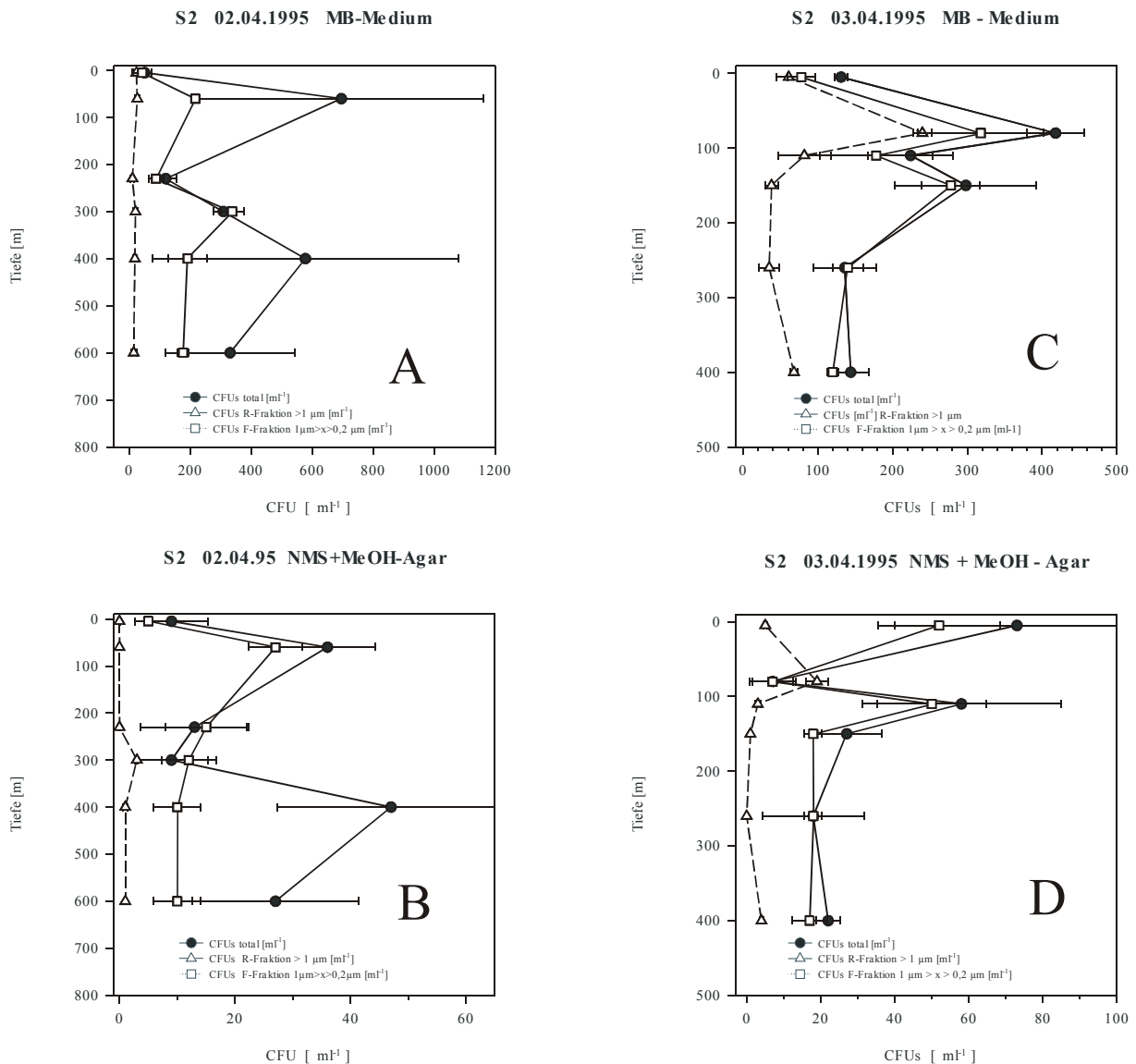


Abbildung 5: Anzahl der Colony Forming Units (CFUs) in Abhängigkeit von der Wassertiefe. Wasserproben aus verschiedenen Wassertiefen wurden am 02.04.1995 und am 03.04.1995 an der Station S2 entnommen. A: 02.04.1995, heterotrophe CFUs; B: 02.04.1995, methylotrophe CFUs; C: 03.04.1995, heterotrophe CFUs; D: 03.04.1995, methylotrophe CFUs. Die Ausplattierung erfolgte in Triplikaten. Fehlerbalken ergeben sich aus den Standardabweichungen. Abkürzungen: MB, Marine Broth; NMS + MeOH, Mineralsalzagar supplementiert mit Methanol; R-Fraktion, partikuläre Fraktion (Retentat auf 1 µm Nucleopore – Filter); F-Fraktion, freilebende Fraktion (Filtrat, welches einen 1 µm Nucleopore – Filter passiert).

### 3.1.1.2 Eutrophe Station S1

Die CFU - Anzahlen an Station S1 sind in Abbildung 6 dargestellt.

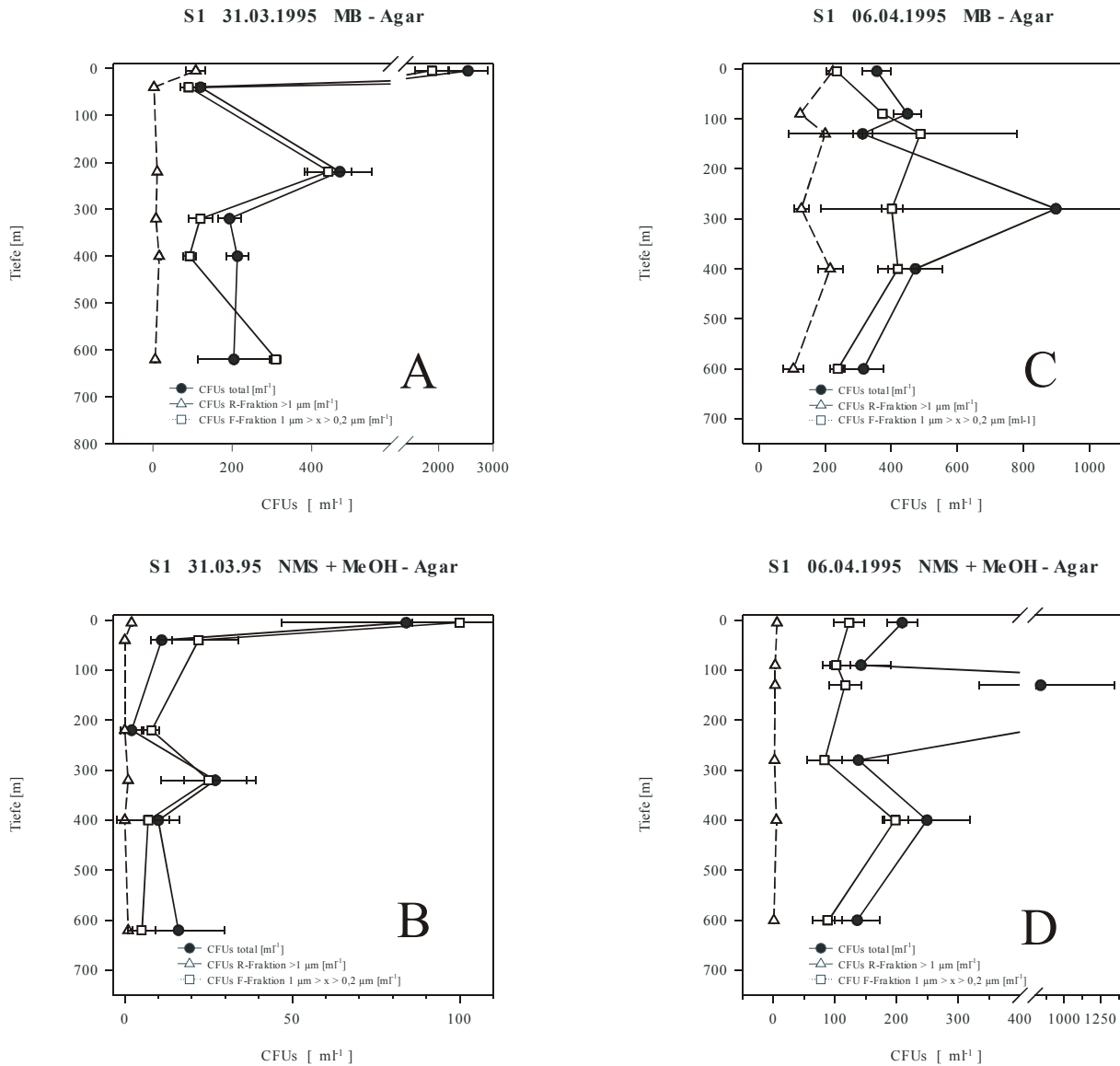


Abbildung 6: Anzahl der Colony Forming Units (CFUs) in Abhängigkeit von der Wassertiefe. Wasserproben aus verschiedenen Wassertiefen wurden am 31.03.1995 und am 06.04.1995 an der Station S1 entnommen. Die Ausplattierung erfolgte in Triplikaten. A: 31.03.1995, heterotrophe CFUs; B: 31.03.1995, methylootrophe CFUs; C: 06.04.1995, heterotrophe CFUs; D: 06.04.1995, methylootrophe CFUs. Fehlerbalken ergeben sich aus den Standardabweichungen. Abkürzungen Abbildung 5.

Es zeigte sich, daß die CFU – Anzahlen der Gesamtfraktion und der freilebenden Fraktion (Filtrat,  $< 1 \mu\text{m}$ ) gut miteinander korrelierten (Korrelationskoeffizienten für CFUs von MB –, TSI – und  $\frac{1}{2}$  ZB +  $\text{NO}_3^-$  – Agar zwischen Gesamt – und freilebender Fraktion zwischen 0,96 und 0,93, für NMS + Methanol – Agar war die Korrelation mit 0,73 deutlich geringer), während die partikelgebundene Fraktion (Filterretentat,  $> 1 \mu\text{m}$ ) regelmäßig nur einen Bruchteil der CFU - Zahlen der Gesamtfraktion darstellte und deutlich schwächer bis schlecht mit den CFU – Zahlen der Gesamtfraktion korrelierte.

Vergleicht man die Anzahl der CFUs, die aus den entsprechenden Wasserproben auf verschiedenen Medien gewonnen wurden, zeigt sich, daß auf dem komplexen MB – Medium die höchsten Anzahlen an CFUs heranwuchsen (siehe auch Abbildung 7). Die CFU – Zahlen von MB – Agarplatten lagen durchweg um ein bis drei Größenordnungen über den CFU – Zahlen für die anderen verwendeten, sehr selektiven Medien, nämlich NMS + Methanol Agar (selektiv für methylo trope Bakterien), TSI – Agar (extrem nährstoffreiches Medium) und  $\frac{1}{2}$  ZB +  $\text{NO}_3^-$  (anaerobe Inkubation, selektiv für denitrifizierende bzw. fermentierende Mikroorganismen). Bei den drei übrigen verwendeten Medien stößt man bei diesem Probenmaterial an die Grenze der mit CFUs sinnvoll zu erfassenden Zellzahlen, wenn man nicht mehr als 200  $\mu\text{l}$  Wasserprobe pro Agarplatte auszuplattieren gedenkt und für die signifikante Erfassung von CFUs wenigstens das Heranwachsen von 10 Kolonien pro Platte erwartet.

Offensichtlich aber wurde, wie in Abbildung 8 dargestellt, selbst mit dem effizientesten verwendeten Medium zur Isolierung nur ein kleiner Bruchteil aller vorkommenden Bakterien erfaßt: Ein Vergleich der Anzahl von CFUs mit der Gesamtzellzahl, bestimmt nach DAPI Counts zeigte, daß sich auf Agarplatten, je nach verwendetem Medium zwischen  $10^3$  bis  $10^6$  Zellen pro Liter Meerwasser erfassen ließen, während die bakterielle Abundanz *in situ*, DAPI Counts zufolge, zwischen Zellzahlen von  $10^8$  bis  $10^9$  Zellen pro Liter angesiedelt war. Kombiniert man die Abundanz nach DAPI – Counts mit der Nachweisgrenze für CFUs (Volumen der unverdünnten Probe je Agarplatte maximal 100  $\mu\text{l}$  bis 200  $\mu\text{l}$ ), kann man abschätzen, daß durch Isolate repräsentierte Taxa *in situ* mit einer Abundanz von mindestens  $10^4$  bis  $10^5$  Zellen pro Liter vorkommen müssen, um durch Ausplattierung von Wasserproben mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit erfaßt zu werden. Allerdings erscheint eine Abundanz eines Taxons mit  $10^4$  bis  $10^5$  Zellen pro Liter vergleichsweise niedrig, wenn andere Taxa möglicherweise Abundanzen von mehr als  $10^8$  Zellen / Liter erreichen. Um zu klären, ob die Abundanz von Isolat en auch eine Abundanz *in situ* reflektieren könnte, wurde versucht bakterielle Abundanzen kultivierungsunabhängig zu erfassen, im Rahmen dieser Arbeit mittels Denaturierender Gradienten - Gel Analyse (DGGE), sowie im Rahmen des EMPS – Projektes durch 16S rRNA – Genanalyse einer Klonbank, die ein Kooperationspartner, Dr. Richard Christen (Observatoire Zoologique Villefrance sur Mer / Frankreich) anhand von Probenmaterial durchgeführt hat, welches an den Probennahmetagen von den entsprechenden Stationen entnommen wurde (Ruimy *et al.*, 1997).

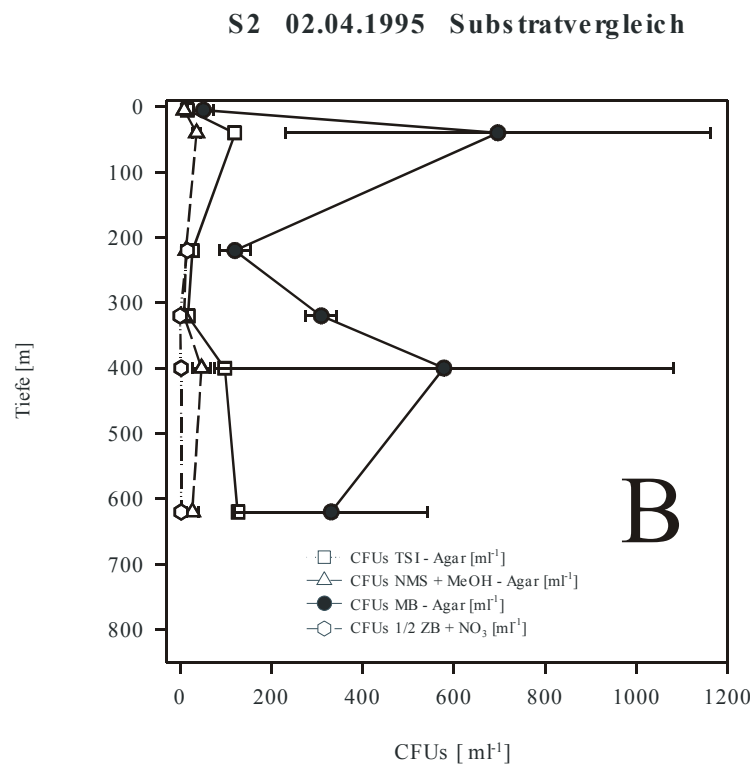
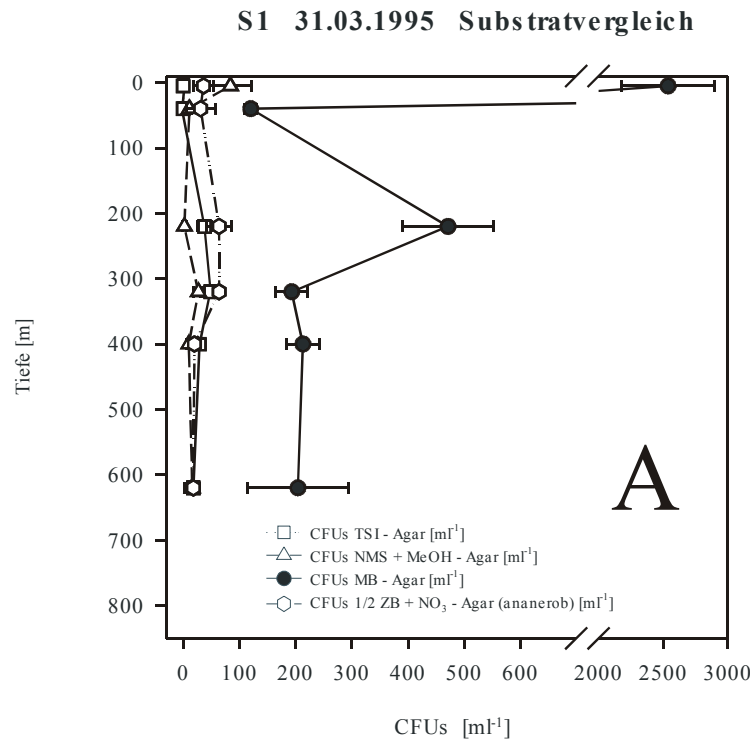
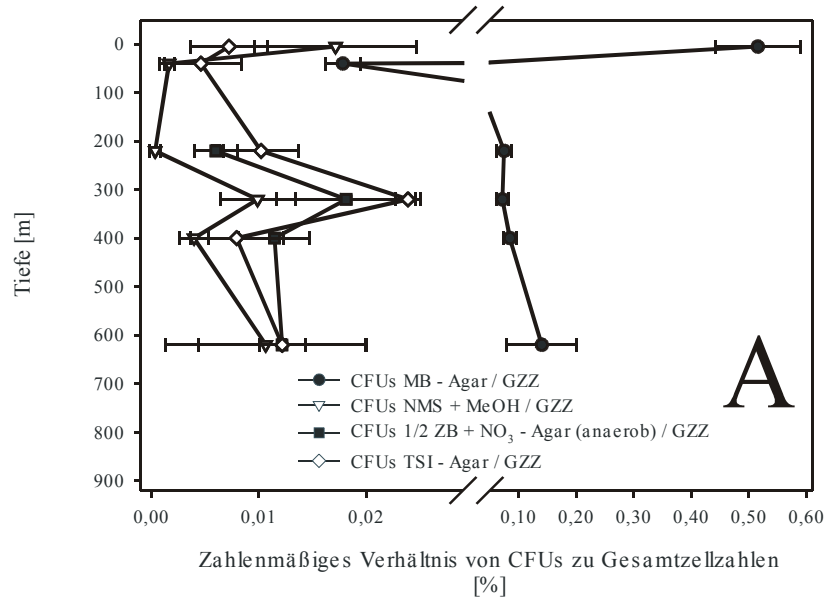


Abbildung 7: Vergleich der Anzahl an Colony forming units (CFUs) / ml Meerwasserprobe auf verschiedenen Medien. Abkürzungen: TSI, Triple Sugar Iron Agar; 1/2 ZB + NO<sub>3</sub>, halbkonzentrierter ZoBell – Agar, supplementiert mit NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A: CFUs von Station S1; B: CFUs von Station S2. Weitere Abkürzungen siehe Abbildung 5.

## S1 31.03.1995 Plattierungseffizienz



## S2 02.04.1995 Plattierungseffizienz

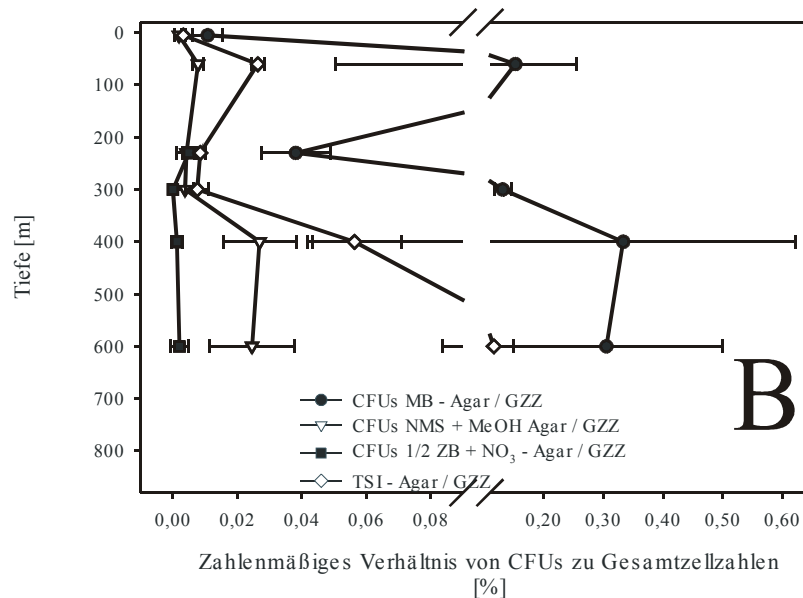


Abbildung 8: Prozentsatz der kultivierbaren Bakterien: Verhältnis von Colony forming units (CFUs), bestimmt durch Ausplattieren von Meerwasserproben auf verschiedenen Medien, zu Gesamtzellzahlen (GZZ), bestimmt durch mikroskopische Auszählung DAPI – gefärbter Bakterien Meerwasserproben. A: CFUs von Station S1; B: CFUs von Station S2. Abkürzungen siehe Abbildung 5 und Abbildung 7.



### 3.1.2 Definition der Nomenklatur für bakterielle Isolate

Im Verlaufe der Untersuchung wurden insgesamt 227 Stämme von den Agarplatten isoliert. Die Nomenklatur der Stämme erfolgte, aus Gründen der Übersichtlichkeit und zur Erleichterung der Datenverarbeitung, nach einem Schema. Das Schema wurde so gewählt, daß sich aus einem möglichst kurzen Namen eine möglichst große Anzahl an Informationen zu dem betreffenden Stamm entnehmen läßt.

Beispiele sind:

V4.BO.10

V4.ME.20

V4.MS.22

V4.BP.01

Dabei bedeutet:

- **V4:** Die beiden Zeichen vor dem ersten Punkt bezeichnen Herkunft der Proben und den Zeitpunkt der Probennahme: V steht für Villefrance s. M., den Ort der Probennahme, 4 steht für den Monat April, in dem diese Probennahme stattfand.

Aus den beiden Zeichen zwischen den zwei Punkten lassen sich Informationen zu Isolationsmedium und dem Ort der Isolation ablesen.

- **B oder M:** Der erste dieser Buchstaben, B oder M, zeigt an, von welchen Nährmedien das Isolat gewonnen wurde. B (Abk. für MB-Medium) zeigt, daß das Isolat heterotroph angereichert wurde, M (Abk. für NMS+Methanol-Medium) symbolisiert die Herkunft aus der methylo trophen Anreicherung.
- **E, O, P oder S:** Der zweite Buchstabe, E, O, P oder S, weist auf die genaue Herkunft des Isolates hin: E (Abk. für eutroph) bedeutet Station S1, O (Abk. für oligotroph) symbolisiert Station S2, P (Abk. für Planktonnetz) steht für das Retentat aus einem Planktonnetz (Porenweite 10 µm), mit welchem an Station S2 Aggregate und Picoplankton gesammelt wurden und S (Abk. für marine snow) wurde für Stämme vergeben, die von „marine snow“ (durch Taucher mit Spritzen gesammelt) isoliert wurden. S und P – Stämme repräsentieren somit Stämme, die assoziiert mit marinen Aggregaten des Oberflächenwassers (bis 40 m) vorkommen.
- Die beiden Zahlen nach dem zweiten Punkt schließlich dienen der fortlaufenden Numerierung der Stämme.

### **3.1.3 LMW – RNA – Profile**

#### **3.1.3.1 *Optimierung der computergestützten Auswertung***

##### **3.1.3.1.1 Das „Clusteranalyse – Problem“ bei LMW – RNA – Profilen**

Im Unterschied zu anderen Nucleinsäure - basierten Fingerprint - Methoden sind die einzelnen Bandenklassen der LMW - RNA Profile sehr verschieden in ihrer Wichtigkeit für die Zuordnung zu einzelnen OTUs. Beispielsweise sind gewisse Unterschiede im - auf dem Gel oft nur gering aufgelösten - Klasse I tRNA - Pool oft ohne Bedeutung hinsichtlich der Zuordnung eines Isolates zu einer OTU und müssen folglich ignoriert werden, andererseits aber besitzt die 5S rRNA eines Isolates, wie unten dargestellt, eine sehr hohe taxonomische Bedeutung.

Da die einzelnen Banden der LMW - RNA Profile so sehr unterschiedlich hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Zuordnung zu OTUs sind, ist leicht einzusehen, daß herkömmliche Clusteranalyse - Methoden keine computergestützte automatisierte Identifikation erlauben. Dies wird durch folgende Sachverhalte verschärft: Eine Clusterung kann erfolgen durch Vergleich der Bandenpositionen, zum einen ohne Berücksichtigung der Intensitäten der einzelnen Banden und zum anderen mit Berücksichtigung der Bandenintensitäten. In ersterem Fall treten Probleme auf, weil die zur Unterscheidung relevanten Banden in einem engen Bereich zwischen ca. 98 und 80 Nucleotiden mit einem Schwerpunkt zwischen 92 und 85 nt verteilt sind und offensichtlich nicht homologe Banden mit unterschiedlichen Intensitäten als übereinstimmend erkannt werden können, alleine weil sie eine identische Größe besitzen. Im zweiten Fall treten Probleme auf, weil der Bereich des Klasse I tRNA - Pools bei allen untersuchten Stämmen im Bereich zwischen 79 und 72 nt liegt und in der Regel mehr als 50 % der gesamten prozentualen spurinternen OD (%IntOD) niedermolekularer RNAs einer Größe von weniger als 140 nt auf sich vereinigt. Geringfügige Unterschiede in diesem – taxonomisch unbedeutendem, weil mit der verwendeten Methode niedrig aufgelöstem - Abschnitt können folglich große Auswirkung auf die Zuordnung der betreffenden Stämme haben, während die taxonomisch sehr bedeutende 5S rRNA mit einer %IntOD zwischen 1 % bis maximal 10 % zu wenig berücksichtigt wird (Höherauflösende Analysemethoden erlauben allerdings eine weitere Differenzierung sehr nahe verwandter bakterieller Stämme nach ihrem Klasse I tRNA – Bandenmuster (Höfle & Brettar, 1996)). Verschärft wird die Situation noch dadurch, daß einzelne Banden gelbedingte Laufunterschiede von  $\pm 1$  nt innerhalb eines Profiles aufweisen können und deswegen bei einer computergestützten Auswertung homologe Banden oft nicht als übereinstimmend erkannt werden. In der Tat blieben alle Versuche erfolglos, mit LMW – RNA Profilen konsistente und reproduzierbare Cluster – Analysen

durchzuführen. Es galt also, zunächst eine zuverlässige Methode zum Aufbau einer computergestützten LMW – RNA – Profil Datenbank zu entwickeln.

## Evaluation einer Identifikationsmethode

Das Problem bei der Verwendung herkömmlicher Cluster – Algorithmen zur Analyse von LMW – RNA – Profildaten besteht darin, daß bei gleicher Wichtung aller Banden die Bedeutung taxonomisch wichtiger Banden in der Gesamtauswertung zu gering ist und der Einfluß unbedeutender Banden zu groß, um eine korrekte Gruppierung bzw. Identifizierung zu ermöglichen. Im Weiteren wurde deshalb ein Ansatz verfolgt, der auf Beobachtungen von (Höfle, 1998), (Höfle, 1990a), (Höfle, 1988) basiert und von anderen Arbeitsgruppen (z.B. (Velazquez *et al.*, 1998), (Casamayor *et al.*, 1998)) bestätigt wurde: Den unterschiedlichen Klassen stabiler LMW – RNA kommt eine unterschiedliche taxonomische Bedeutung zu: Während die 5S rRNA zwar die Unterscheidung entfernt verwandter, nicht aber nahe verwandter Taxa ermöglicht, erlauben die Klasse II tRNAs die Differenzierung unterhalb des Genus – Levels, ermöglichen aber keinen sinnvollen Vergleich oberhalb dieses taxonomischen Rangs (für eine Diskussion über Differenzierung bakterieller Stämme anhand ihrer Klasse I tRNA - Bandenmuster siehe (Höfle & Brettar, 1996), (Höfle, 1998)). Sinnvollerweise sollten also die einzelnen Klassen der LMW – RNAs unabhängig voneinander analysiert werden, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Vergleiche einander nicht entsprechender Banden zu verhindern. Das wurde auf folgende Weise umgesetzt: Ausgehend von LMW – RNA Profilen von Stämmen mit bekannter taxonomischer Position (16S RNA – Sequenz, charakterisierte Referenzstämme) wurde ein hierarchisches Regelwerk von Kriterien aufgestellt, gemäß dem LMW - RNA Profile sortiert werden sollten. Als Voraussetzungen für dieses Regelwerk wurden folgende Annahmen gemacht: Erstens, einander entsprechende (= homologe) Banden zweier Profilmuster besitzen eine ähnliche absolute (IntOD) und relative (%IntOD) interne optische Dichte und zweitens, im Vergleich von RNA - Profilen wurden Größenschwankungen von  $\pm 1$  nt je Bande toleriert (bezogen auf den Molekulargewichtsstandard des betreffenden Gels). Jede Bande wurde diese Schwankungsbreite unabhängig von der Position aller übrigen Banden innerhalb des LMW - RNA – Profilmusters gewährt. Unter Berücksichtigung dieser Annahmen wurden die LMW - RNA Profile in folgender Reihenfolge hierarchisch sortiert:

- 1) **Zwei Banden im Bereich oberhalb 115 nt ?** Ist oberhalb der 5S rRNA - Bande eine zweite Bande lokalisiert (23S rRNA – Fragment (siehe (Haas, 1997)))
- 2) **Größe der 5 S rRNA:** Zweitwichtigstes Kriterium für den Vergleich der Ähnlichkeit war die Nucleotidzahl der 5S rRNA.
- 3) Dritte Priorität hatte das **Vorhandensein einzelner, sehr charakteristischer Banden**, beispielsweise ausgewählte Klasse II – tRNAs oder die unterhalb des Klasse I - tRNA

Pools lokalisierte *Pseudomonas* – Bande, indikativ für den Genus *Pseudomonas sensu stricto* (Höfle, 1992a). Welche Banden eine hervorragende Bedeutung eingeräumt bekamen, wurde aus dem Vergleich der LMW – RNA Profile von Referenzstämmen bekannter taxonomischer Position entschieden.

- 4) Anschließend wurden **Position und Intensität der übrigen Klasse II – tRNA Banden** verglichen.
- 5) Zuletzt wurde die **Klasse I – tRNAs** berücksichtigt.

Diese fünf Kriterien werden im Folgenden als Ebenen bezeichnet. Der Sortiervorgang einer untergeordneten Ebene wurde immer erst dann begonnen, wenn der Sortiervorgang auf der übergeordneten Ebene abgeschlossen war. Das hat folgende Konsequenz: Im Unterschied zu einer herkömmlichen Clusteranalyse wurden zwei Banden z.B. bei 70 nt (siehe unten) nicht als übereinstimmend gewertet, wenn die übergeordnete Ebene, beispielsweise die 5S rRNA Banden, nicht als übereinstimmend gewertet worden waren. Prinzipiell wurde dadurch eine Clusterung zwischen Isolaten mit ähnlichen tRNA – Bandenmustern aber unterschiedlichen 5S rRNA Banden verhindert. Am Beispiel der im Laufe der Untersuchung gefundener OTUs wurde durch dieses streng hierarchische Vorgehen verhindert, daß im Vergleich der zwei OTUs S und P einerseits sowie der OTU K andererseits die Banden einer Größe von ca. 70 nt unterhalb des Klasse I tRNA - Pools als übereinstimmend erkannt wurden - ein Befund, der durch spätere 16S rRNA Sequenzierung gestützt werden konnte: Während die OTUs P und S dem Genus *Pseudomonas sensu stricto* zuzuordnen sind, gehört die OTU K zum hierzu nicht näher verwandten Genus *Psychrobacter*. Die 70 nt - Bande der OTUs S und P kann nicht als übereinstimmend mit der 70 nt - Bande der OTU K betrachtet werden, weil zahlreiche Stämme, die taxonomisch zwischen diesen OTUs lokalisiert sind, diese 70 nt Bande nicht besitzen, eine Homologie der 70 nt Bande somit unwahrscheinlich ist. Eine herkömmliche Clusteranalyse hätte aufgrund der Übereinstimmung in diesem Merkmal den Genus K näher an die OTUs S und P gerückt, als dies tatsächlich der Fall ist.

Zur Organisation der Datenbank: Um den Zugriff auf bestimmte RNA - Profile innerhalb einer Datenbank z.B. für Identifikationszwecke zu ermöglichen, wurde **eine kombinierte Datenbank** konzipiert. Diese kombinierte Datenbank besteht aus zwei Teilen, erstens dem **Bestimmungsschlüssel**, der den geordneten Zugriff auf die Datenbank ermöglicht und zum anderen der eigentlichen **Datenbank**, die alle analysierten LMW - RNA Profile in normierter Form enthält (d.h. korrigiert nach gelabhängigen Laufunterschieden). Der Bestimmungsschlüssel besteht aus den unten erläuterten Elementen Ebene, Kategorie, Frage, Schlüssel und LMW - RNA OTU und ermöglicht Identifikation und Sortierung der LMW - RNA - Profile. Die Datenbank enthält die einzelnen "normalisierten" (nach bei individuellen Gelen auftretenden Ungleichmäßigkeiten im Laufverhalten korrigierten) und nach bestimmten Kriterien sortierten und zu OTUs zusammengefaßten LMW - RNA Profilen.

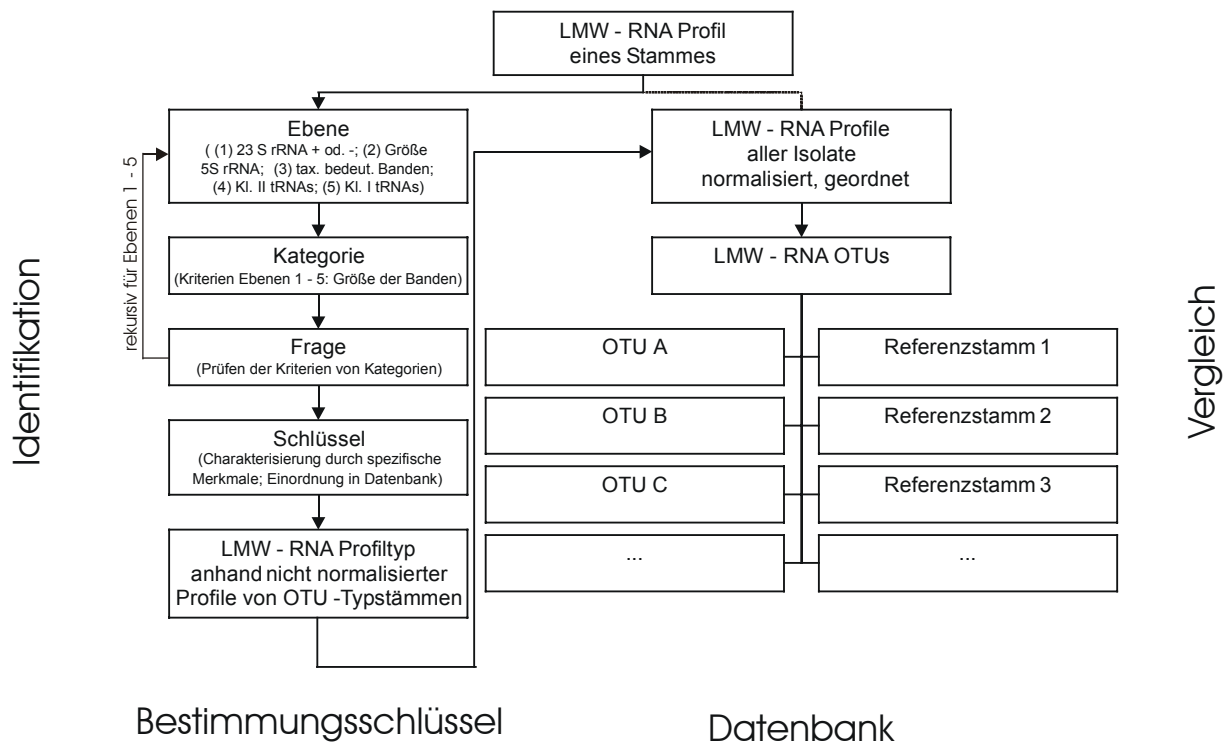


Abbildung 9: Definition der Begriffe der kombinierten Datenbank von LMW - RNA Profilen. Weitere Erläuterung siehe Text. Abkürzungen: + od. -, vorhanden oder nicht vorhanden; tax. bedeut., taxonomisch bedeutende.

## Bestimmungsschlüssel

Das Navigationswerkzeug der Datenbank ist der Bestimmungsschlüssel. Mit seiner Hilfe wird der Zugriff auf LMW - RNA - Profile anhand objektiver, überprüfbarer Kriterien, ermöglicht. Die Orientierung innerhalb der Datenbank wird durch fünf den Bestimmungsschlüssel strukturierende Elemente ermöglicht: Ebenen, Kategorien, Fragen, Schlüssel und schließlich LMW - RNA - Profiltypen. Diese Elemente sind hierarchisch geordnet: Eine **Ebene** umfaßt mehrere **Kategorien**, innerhalb einer Kategorie werden mehrere Kriterien durch **Fragen** geprüft, jede Frage verweist auf mehrere **Schlüssel**, welche spezifisch jeweils **eine LMW - RNA OTU** beschreiben. Anschließend eine kurze Definition dieser Begriffe:

- (1) Die Datenbank ist hierarchisch in **Ebenen** unterteilt. Diese Ebenen entsprechen den Kriterien in der Reihenfolge, nach denen die LMW - RNA Profile hierarchisch sortiert wurden (① Vorhandensein fragmentierter 23S rRNA; ② Größe der 5S rRNA; ③ weitere taxonomisch besonders signifikante Banden; ④ Klasse II tRNAs; ⑤ Klasse I tRNAs).
- (2) Jede Ebene ist in verschiedene **Kategorien** unterteilt. Beispiel: Ebene 2 (Größe der 5S rRNA) ist in die Größenkategorien der einzelnen 5S rRNAs unterteilt (122 nt, 121 nt, 120 nt ... 111 nt). Die Kategorien der verschiedenen Ebenen sind Größenangaben von Banden.
- (3) Der Verweis auf untergeordnete Ebenen oder auf Kategorien innerhalb von Ebenen erfolgt durch **Fragen**. Die Fragen werden in **alphanumerischer Reihenfolge** bezeichnet, welchen die Kategorien übergeordneter Ebenen vorangestellt werden, nach denen eine

Sortierung bisher erfolgt war. Praktisch werden diese Kategorien durch die Größe der Banden bezeichnet, nach denen das Bandenmuster bislang einsortiert wurde. Die erste Frage der obersten Ebene ist die Frage A, zum Beispiel bezeichnet 120-A die erste Frage der Kategorie 120 nt auf der zweiten Ebene.

- (4) Einzelne LMW - RNA - Typen (LMW - RNA - OTUs) werden durch datenbankintern eindeutige **Schlüssel** definiert, die sich aus einer Auflistung aller Kategorien (= Größen der Banden) der verschiedenen Ebenen ergibt, in der Reihenfolge, in welcher die Sortierung erfolgt ist. Gültige Schlüssel enthalten, im Unterschied zu Fragen, keinerlei alphanumerische Zeichen, sondern bestehen nur aus Zahlen, den Nucleotidanzahlen der Banden in der Reihenfolge der Einsortierung.
- (5) Zu **LMW - RNA - Profiltypen** (LMW - RNA - OTUs) werden alle Bakterienstämme zusammengefaßt, deren LMW - RNA - Profiltypen nach den oben dargestellten Kriterien als übereinstimmend erkannt wurden.

## **Beispielsuche**

Im Unterschied zu herkömmlichen, bei Clusteranalysen verwendeten Algorithmen ist bei dem dargestellten Verfahren nicht nur das Vorhandensein oder die Abwesenheit einzelner Banden bzw. deren Intensitäten entscheidend, sondern auch die Reihenfolge, in welcher diese Merkmale verglichen werden. Um das Prinzip dieses Verfahrens zu verdeutlichen, ist im Folgenden explizit die Einsortierung der mediterranen Isolate in die Datenbank beschrieben.

### **Ebene 1**

LMW - RNA Profile wurden zunächst nach dem Kriterium der Ebene 1 sortiert, nämlich dem Vorhandensein und der Größe eines 23S rRNA Fragmentes im Bereich 115 - 140 nt. Es entstanden zunächst zwei Gruppen: Profile, die dieses Merkmal besaßen und solche, die es nicht besaßen. Die Profile, die ein 23S rRNA Fragment besaßen, ließen sich nach der Größe dieses Fragmentes differenzieren: Es entstanden die Kategorien >140, 135, 130 und 126, sowie die Kategorie "ohne fragmentierte 23S rRNA", insgesamt also fünf Kategorien auf Ebene 1.

### **Ebene 2**

Wichtig war, daß von nun an jede der fünf auf Ebene 1 entstandenen Kategorien unabhängig von den anderen nach den Kriterien von Ebene 2, der Größe der 5S rRNA durchsucht wurde. Es fanden also fünf unabhängige Sortiervorgänge nach der Größe der 5S rRNA statt. Auf Ebene 2 entstanden nach Durchmusterung aller Profile insgesamt folgende 13 Kategorien:

**23S rRNA fragmentiert**

Ebene 1 [nt]	Ebene 2 [nt]
>140	- 118
135	- 120
130	- 118
126	- 121

**23S rRNA nicht fragmentiert**

Ebene 1 [nt]	Ebene 2 [nt]
	122
	121
	120
	118
	117
	116
	114
	113
	111

Jede dieser 13 Kategorien wurde unabhängig von allen anderen in Ebene 3 wiederum nach den für diese Ebene gültigen Kriterien durchsucht, dem Vorhandensein (empirisch ermittelter) taxonomisch bedeutsamer Banden. Der Vorgang wurde für alle entstandenen Kategorien auf den Ebenen 4 und 5 wiederholt. Durch Auflistung aller Banden in der Reihenfolge, nach welcher die Einsortierung in die Kategorien der verschiedenen Ebenen erfolgt war, entstand für einen LMW - RNA Profiltyp ein eindeutiger Pfad. Anhand dieses Pfades läßt sich eindeutig der Weg verfolgen, auf dem ein RNA - Profiltyp in die Datenbank einsortiert wurde. Dieser Pfad wird im Folgenden als Schlüssel bezeichnet.

## ***Nomenklatur der Elemente des Bestimmungsschlüssels***

### **Definition: Schlüssel**

Der Zugriff auf LMW - RNA Profile innerhalb einer Datenbank erfolgt mit Hilfe eines Schlüssels, der sich durch Auflistung der Nucleotidzahl der Banden in der Reihenfolge ergibt, nach welcher die LMW - RNA - Profile sortiert und einzelnen Gruppen zugeordnet wurden. Innerhalb einer bestimmten Datenbank ist dieser Schlüssel folglich eindeutig für jede OTU mit als identisch betrachteten RNA - Profilen. Beispielsweise ergibt sich, das Beispiel auf Seite 72 aufgreifend, der spezifische Schlüssel für OTU S nach obengenannten Kriterien folgendermaßen: ① Fragmentierte 23S rRNA ist nicht vorhanden, ② die 5S rRNA hat eine Größe von **120** nt, ③ eine Bande unterhalb des Klasse I tRNA - Pools einer Größe von **71** nt ist vorhanden ("*Pseudomonas* - Bande") und ④ die Differenzierung von OTU P, der einzigen OTU, die ebenfalls o.g. Kriterien erfüllt und als weiteres gemeinsames Merkmal mit OTU S tRNA Banden bei 91, 87 und 86 mit vergleichbarer Intensität besitzt, geschieht durch zwei Klasse II tRNA Banden mit Größen von **90** und **88** nt, welche bei OTU S vorhanden sind, bei OTU P allerdings nicht. 16S rRNA Sequenzierung bestätigt diese Gruppierung: Innerhalb des Genus *Pseudomonas* stehen die Isolate der OTU S der Art *Pseudomonas synxantha* nahe,

während die Mitglieder von OTU P Verwandte von *Pseudomonas stutzeri* sind. Folglich ergibt sich als (datenbankintern) eindeutiger Schlüssel für OTU S 120-71-90-88, mit dessen Hilfe sich zum einen leicht überprüfen läßt, ob ein LMW - RNA - Profil eines zu identifizierenden Bakterienstammes diese Zuordnungskriterien erfüllt und, nach entsprechender Prüfung der IntOD und %IntOD, diesen OTUs zugeordnet werden kann. Weiterhin verleiht dieser Schlüssel eine gewisse Transparenz bezüglich der Auswertung von RNA - Profilen durch mehrere Personen, weil für jeden jederzeit die Entscheidungswege nachvollziehbar sind, aufgrund derer ein bestimmter Stamm einer OTU zugeordnet wurde.

### **Definition: Frage**

Konsequenterweise wird diese Form der Numerierung auch auf die Entscheidungspunkte des Bestimmungsschlüssels, die Fragen, nach welchen Merkmale der Bandenmuster abgeprüft werden, übertragen, mit folgendem Unterschied: Jede Frage erhält vorangestellt die Größen der Banden des Entscheidungsweges, durch welche die Suche auf diese Frage gelenkt wurde, gefolgt von einem Buchstaben, der für jede Alternative jeder Ebene bei A beginnt und alphanumerisch weiternummeriert wird. Das soll am Beispiel der Bestimmung der OTU S verdeutlicht werden: Die Suche beginnt in der obersten Ebene mit der ersten Frage, welche den Buchstaben A trägt. Da das abgefragte Merkmal (zusätzliche Bande im Bereich von 124 - 140 nt) nicht vorhanden ist, wird innerhalb dieser ersten Ebene auf Frage B verwiesen. In Frage B erfolgt die Sortierung nach Größe der 5S rRNA, es erfolgt der Verweis auf die nächste Ebene, die mit der Nummer 120 bezeichnet wird (nach der Kategorie der Einsortierung: 5S rRNA mit einer Größe von 120 nt), nach der Größe der Bande, nach welcher sortiert wurde. Die erste Frage auf dieser zweiten Ebene, 120-A, prüft das Vorhandensein der "*Pseudomonas*" - Bande und verweist auf Frage 120-B. In 120-B erfolgt die Identifikation durch Differenzierung von dem einzigen LMW - RNA - Profil - Typ, der diese Kriterien noch erfüllt, Typ P, anhand zusätzlicher Banden von Typ S bei 90 und 88 nt. Typ S erhält somit, wie oben dargestellt, den eindeutigen Schlüssel 120-71-90-88.

Nach dieser Methode wurde eine Datenbank mit LMW – RNA Profilen mediterraner Isolate aufgebaut. Anschließend wurde Gültigkeit der vorgenommenen Gruppierung anhand von LMW – RNA Profilen von Referenzstämmen und durch 16S RNA – Sequenzierung von Vertretern der LMW – RNA OTUs bestätigt. Bestimmungsschlüssel und Datenbank der LMW – RNA Profile mediterraner Isolate werden im Folgenden so dargestellt, daß ein Vergleich von Profilen unbekannter Stämme mit den Stämmen vorliegender Untersuchung ohne Benutzung eines Computers möglich ist. Alternativ wurde eine computergestützte Datenbank aufgebaut, die sich anhand der im Bestimmungsschlüssel aufgeführten Kriterien mittels SQL – Datenbankabfragen durchsuchen läßt. Im Bestimmungsschlüssel sind Referenzstämmen aus Platzgründen nicht berücksichtigt, werden aber prinzipiell auf die beschriebene Art und Weise in die Datenbank eingefügt.



OTU	Typstamm	nächster 16S rRNA Verwandter	Phylogenetische Position	Größe frag. 23S rRNA [nt]	Größe 5S rRNA [nt]	Größe Kl. II tRNAs [nt]	Größe Kl. I tRNAs [nt]
A	V4.BO.03	<i>Sphingomonas</i> / <i>Erythrobacter</i> like sp.	$\alpha$ -Proteo	135	120	93, 92, 91, 90, 89, 88, 86, 85	79 - 73
B	V4.BE.10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	$\gamma$ -Proteo	-	119, 118	95, 94, 92, 87, 86, 85	78 - 74
C	V4.BP.07	<i>Vibrio</i> sp.	$\gamma$ -Proteo	-	120	96, 95, 93, 90, 89, 88, 86	78 - 73
D	V4.ME.27	<i>Rhodococcus fascians</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121)	92, 91, 89, 88, 86, 85	78 - 73
D'	V4.MO.13	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121)	93, 92, 91, 89, 88, 86, 85	77 - 73
F	V4.MO.26	<i>Manganese oxidizing isolate</i>	$\alpha$ -Proteo	126	121	101, 90, 85, 84	77 - 73
G	V4.BE.32	<i>Alteromonas macleodii</i>	$\gamma$ -Proteo	-	120, 119	93, 91, 88, 86	77 - 74
H	V4.BO.10	<i>Brevundimonas intermedia</i>	$\alpha$ -Proteo	126	121	94, 92, 88, 86	77 - 73
H'	V4.BO.07	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	$\alpha$ -Proteo	126	121	96, 92, 88, 86	77 - 73
H*	V4.BP.05	<i>Mycoplana bullata</i> like sp.	$\alpha$ -Proteo	126	121	94, 92, 87, 86, 85	77 - 73
J	V4.MO.09	<i>Micrococcus lylae</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	121	(89), 88, (86), (85)	75 - 71
K	V4.BO.14	<i>Psychrobacter glacinicola</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	116, 113, 112	92, 91, 90, 87, 84, 83, 82	76 - 72, 69
L	V4.ME.25	<i>Acinetobacter johnsonae</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	117, 114, 112	90, 87, 86, 85, 84	75 - 71
L'	V4.BS.03	<i>Acinetobacter</i> sp.	$\gamma$ -Proteo	-	117, 114, 112	91, 90, 87, 86, 85, 84, 83	76 - 72, 70
M	V4.MS.25	<i>Flavobacterium medit. group M</i>	CFB	-	(114), 111, (110)	97, 90, 88, 86, 85	77 - 74
N	V4.ME.19	<i>Nocardioides medit. group N</i>	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121)	(96), (92), 91, 88, 87, (86)	78 - 72
N'	V4.BE.17	<i>Nocardioides</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	123, (122), (121)	95, 92, 90, 89, 88, 86, 85	77 - 73
N*	V4.BO.15	<i>Nocardioides medit. group N*</i>	<i>Actinobacteria</i>	-	122	90, 88, 87	77 - 73
O	V4.BO.31	<i>Rhodotorula</i> sp.	Fungi	> 140	119	88, 87, 86, 85, 83	77 - 72
P	V4.MO.16	<i>Pseudomonas stutzeri</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	120, 119, 116	91, 87, 86	75 - 72, 70
Q	V4.BS.12	<i>Dermatophilus</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	121	98, 95, 93, 89, 88	77 - 72
R	V4.BS.11	<i>Arthrobacter medit. group R</i>	<i>Actinobacteria</i>	-	120	93, 92, 91, 89, 87, 86, 85	76 - 71
S	V4.BP.03	<i>Pseudomonas synxantha</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	120, 119	91, 90, 88, 86, 85	75, 74, 71
T	V4.BE.06	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes LGC	-	118	106, (105), 99, 93, 90, 87, 85, 84	78 - 73
V'	V4.ME.09	<i>Flavobacterium medit. group V'</i>	CFB	-	(121), 113, (111)	(92), 90, 89, 87, 86, (85), (83), (82)	78 - 73
W	V4.MS.05	<i>Deleya aquamarina</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	120, 114	95, 94, 92, 89, 88, 87, 86	78, 76 - 71
X	V4.MS.24	<i>Marinobacter</i> sp.	$\gamma$ -Proteo	-	120, 112	92, 91, 88, (87), 86, 85	78, 76-73
Y	V4.MS.17	<i>Methylophaga</i> sp.	$\gamma$ -Proteo	-	118	92, 91, 88, 86, 85	75 - 71
Z	V4.MS.12	<i>Cytophaga marinoflava</i> like sp.	CFB	-	114, (111)	98, 93, 90, 89, 88, 87	78 - 73

OTU	Typstamm	nächster 16S rRNA Verwandter	Phylogenetische Position	Größe frag. 23S rRNA [nt]	Größe 5S rRNA [nt]	Größe Kl. II tRNAs [nt]	Größe Kl. I tRNAs [nt]
1	V4.BE.47	<i>Arthrobacter crystallopoites</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121)	94, 93, 91, 89, 88, 86, 84	77 - 70
2	V4.BO.43	<i>Janibacter</i> sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121), (119)	(95), 92, (91), 89, (88), 87, 85, (83)	76 - 72
3	V4.BP.06	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Firmicutes</i> LGC	-	116	n.d.	n.d.
4	V4.BP.08	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	(122), 121	95, 94, 92, 87, 86	77 - 75, 73, 72
4	V4.BP.15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	121, (120)	94, 92, 87, (86), ...	78 - 72
5	V4.BO.19	<i>Alcanivorax</i> sp.	$\gamma$ -Proteo	-	121, (120)	98, 92, 91, 88, 85, 84	79 - 73
nd	V4.BP.10	<i>Roseobacter</i> like sp.	$\alpha$ -Proteo	129	118	92, 90, 88, 86, 85, 84	78 - 72
nd	V4.ME.23	<i>Roseobacter</i> like sp.	$\alpha$ -Proteo	130	118	91, 86, 84	77 - 72
nd	V4.BO.09	<i>Caulobacter</i> sp.	$\alpha$ -Proteo	128	121	98, 90, 86, 85	78 - 70
nd	V4.BE.23	<i>Dietzia maris</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	(122), 121	(94), 92, 90, 87, 86, (84)	77 - 73
nd	V4.BO.29	<i>Clavibacter</i> sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121)	94, 91, 88, 87, 86	78 - 72
nd	V4.BP.16	<i>Micrococcus lylae</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122, (121)	93, 90, 89, 88, 87	78 - 71
nd	V4.MO.30	<i>Micrococcus lylae</i> like sp.	<i>Actinobacteria</i>	-	122	92, 91, 89, 87, 85	77 - 71
nd	V4.BO.41	<i>Xanthomonas</i> like sp.	$\gamma$ -Proteo	-	(121), 120	95, 94, 92, 87, 86	77 - 72
nd	V4.BS.09	<i>Flavobacterium</i> sp.	CFB	-	111	98, 92, 90, 89, 87, 86	78 - 74
nd	V4.BE.50	<i>Flavobacterium salegenes</i> like sp.	CFB	-	(113), 111, (110)	90, 88, 87	77 - 74
nd	V4.MS.32	<i>Cyclobacterium</i> like sp.	CFB	-	(111), 110	n.d.	77 - 73
nd	V4.BE.30	<i>Bacillus cereus</i> like sp.	<i>Firmicutes</i> LGC	-	116	(94), 89, 87, 85	78 - 73
nd	V4.MO.03	<i>Ustilago</i> sp.	<i>Fungi</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 10 (Seiten 77 und 78): Definition der Operational taxonomic units (OTUs) mediterraner Isolate anhand von LMW - RNA - Profilen und 16S RNA Sequenzen. In Klammern gesetzte Bandengrößen symbolisieren schwache Banden, die nicht auf allen LMW - RNA Profilen zu erkennen sind. OTU 4 wird in obiger Tabelle zweimal aufgeführt, der Typstamm der OTU ist V4.BP.08. Abkürzungen: ähnl. ähnlich,  $\alpha$ -Proteo, Alpha – Proteobakterien; CFB, Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroides – Phylum;  $\gamma$ -Proteo, Gamma-Proteobakterien; *Firmicutes* LGC, *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt („low G+C“); medit. mediterran.

### 3.1.3.2 Bestimmungsschlüssel

**A:** Ist oberhalb der 5S rRNA - Bande im Bereich zwischen 124 und 140 nt eine zweite, vergleichbar starke Bande (fragmentierte ribosomale RNA, indikativ für  $\alpha$  - Proteobakterien) zu finden? Wenn ja, welche Größe hat diese Bande?

Ja:

Schlüssel	Bandengröße	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
140-118	> 140 nt	O	Abbildung 10 Seite 80
135-120	135 $\pm$ 2 nt	A	Abbildung 10 Seite 80
	130 / 129 nt	V4.BP.10, V4.ME.23	>125-A
	126 $\pm$ 1 nt	H, H', H*, F	>125-A

Nein: Gehe zu B, Seite 82

#### 3.1.3.2.1 Zwei Banden im Bereich 135 - 115 nt

**>125-A:** 5S rRNA - Bande bei 120 nt oder bei 118 nt?

Schlüssel	5S rRNA - Bande	Kl. II tRNAs	LMW-RNA OTU	Siehe Abschnitt
129-118-92-90	118 nt	92, 90, 88, 86, 85, 84 nt	V4.BP.10	Abbildung 10 Seite 80
130-118-91-86	118 nt	91, 86, 84 nt	V4.ME.23	Abbildung 10 Seite 80
	120 nt	s.u.	A, F, H, H', H*	126-A

**126-A:** Bande bei 101 nt vorhanden?

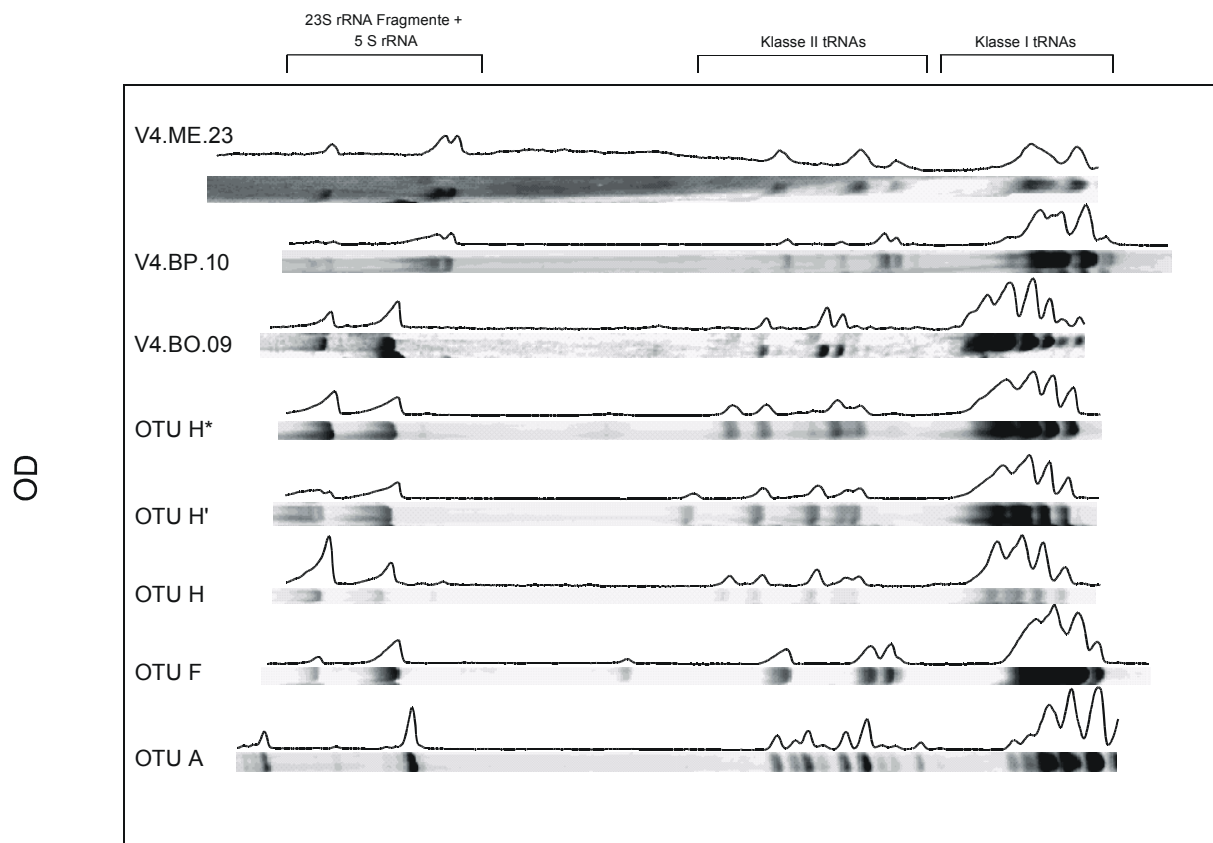
Schlüssel	101 nt Bande	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
126-121-101	Ja	F	Abbildung 10 Seite 80
	Nein	H, H', H*	Gehe zu 126-B

**126-B:** Banden bei 126, 121, 98, 90, 86, 85 nt (Toleranz jeweils  $\pm$  1 nt), 121 nt Bande besitzt eine %IntOD von ca. 10 %?

Schlüssel	Banden vorhanden	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
126-121-98-90	Ja	V4.BO.09	Abbildung 10 Seite 80
	Nein	H, H', H*	Gehe zu 126-C

**126-C: Differenzierung nach Größe der Klasse II tRNA-Banden:**

Schlüssel	Größe der Klasse II tRNAs [nt]	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
126-121-94-86	<b>94, 92, 88, 86</b>	<b>H</b>	Abbildung 10 Seite 80
126-121-96-86	<b>96, 92, 88, 86</b>	<b>H'</b>	Abbildung 10 Seite 80
126-121-94-85	<b>94, 92, 87, 86, 85</b>	<b>H*</b>	Abbildung 10 Seite 80



Elektrophoreserichtung &gt;

Abbildung 10: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern der verschiedenen OTUs mit zwei Banden im Bereich 115 - 140 nt. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: OTUs A (V4.BO.03), F (V4.MO.26), H (V4.BO.10), H' (V4.BO.07), H\* (V4.BP.05), V4.BO.09, V4.BP.10, V4.ME.23. Normalisierte LMW - RNA Profile einzelner Isolate der OTUs siehe Abbildung 11, Seite 81

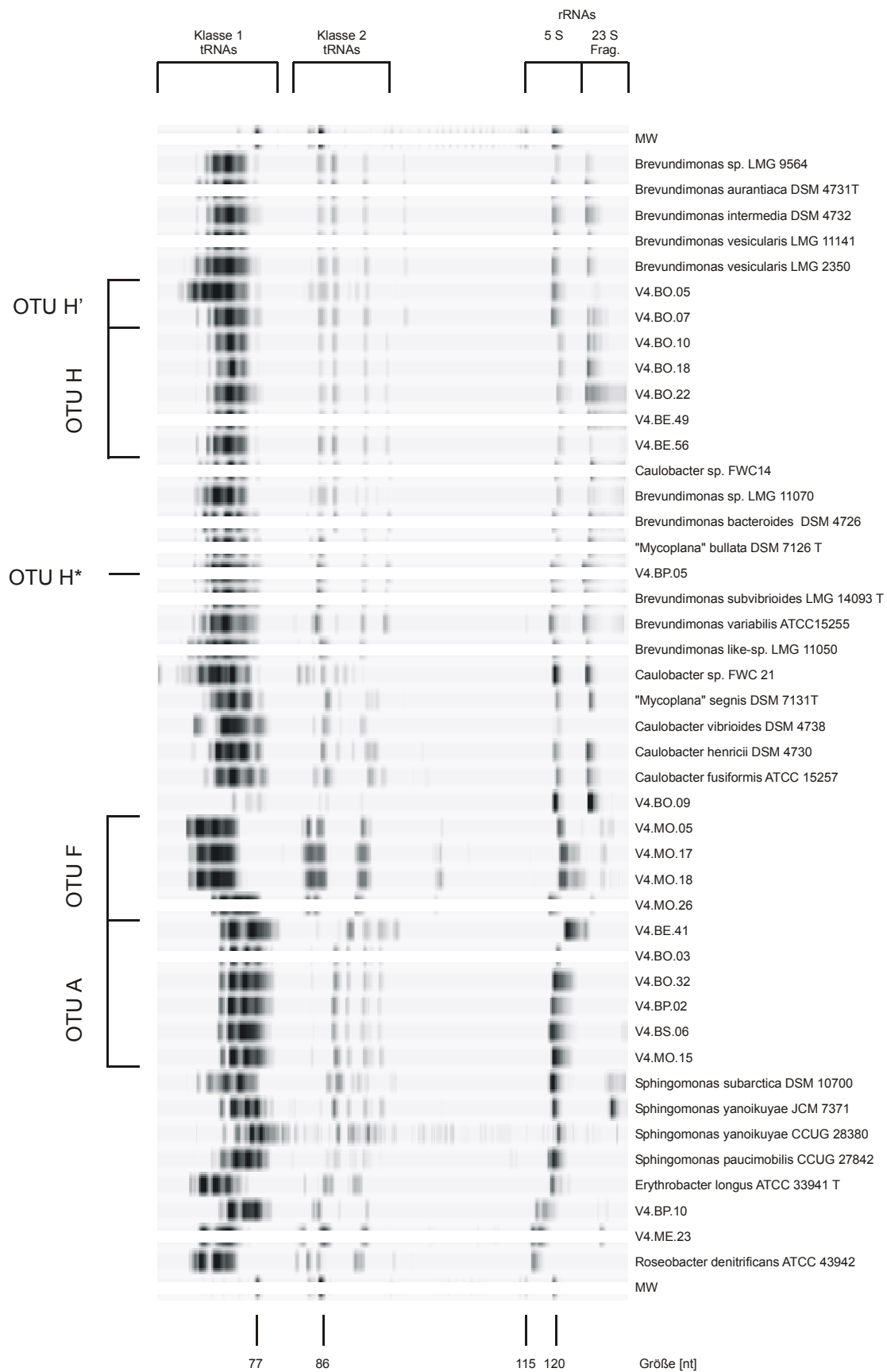


Abbildung 11: Normalisierte LMW - RNA Profile von Isolaten und Referenzstämmen mit zwei Banden im Bereich zwischen 140 und 115 nt. Alle Stämme sind taxonomisch der  $\alpha$  - Subklasse der Proteobakterien zuzuordnen.

### 3.1.3.2.2 Eine Bande (5S - rRNA) im Bereich 135 - 115 nt

**B:** Wie groß ist die 5S rRNA - Bande (Toleranz jeweils  $\pm 1$  nt) ?

Größe 5S rRNA	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
122	D, D', J, N, N', N*, 1, 2	3.1.3.2.2.1
121	Q, 4, 5,	3.1.3.2.2.2
120	C, G, P, R, S, W, X	3.1.3.2.2.3
118	T, B, Y	3.1.3.2.2.4
117	L, L'	3.1.3.2.2.5
116	K, 3	3.1.3.2.2.6
114	V, Z	3.1.3.2.2.7
113	V	3.1.3.2.2.7
111	M	3.1.3.2.2.7

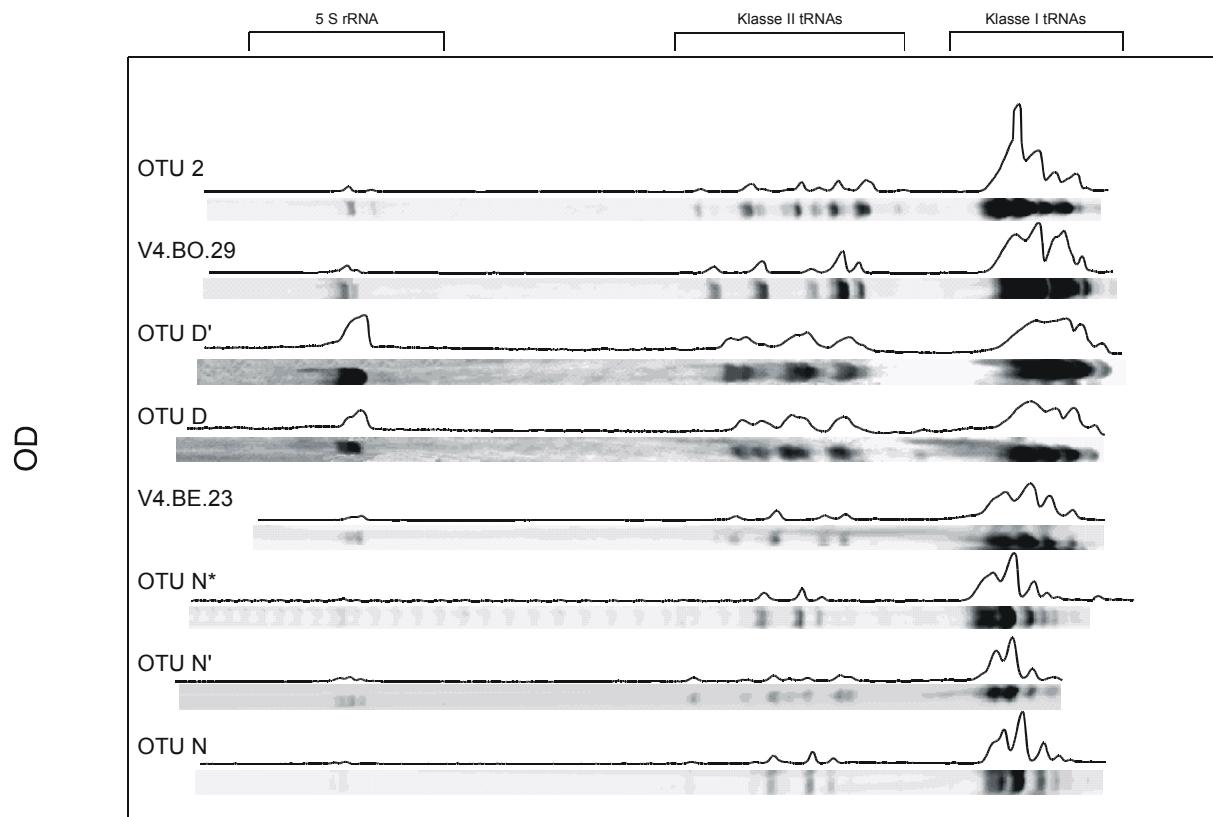
#### 3.1.3.2.2.1 5S rRNA mit 122 nt Größe

Alle Isolate mit 5S rRNAs einer Größe von 122 nt gehören zum Phylum *Actinobacteria*.

**122-A:** 5S rRNA bei 122 nt, partiell hydrolysierte RNA als Hydrolyseleiter mit Abständen von 2 nt erkennbar, Klasse II tRNAs bei 90, 88 und 87 nt: OTU N\*

**122-B:** Weitere Differenzierung nach Anzahl und Größe der Klasse II tRNAs (geordnet nach MW der jeweils größten, deutlich ausgeprägten Klasse II tRNA (%IntOD > 1%); schwache Banden mit einer %IntOD < 1% sind in Klammern aufgeführt)

Schlüssel	Größe der Klasse II tRNAs [nt]	LMW - RNA OTU	Siehe Abbildung
122-95-92	95, 92, 90, 89, 88, 86, 85	N'	Abbildung 12 Seite 83
122-94-93-91	94, 93, 91, 89, 88, 86, 84	1	Abbildung 13 Seite 84
122-94-91	94, 91, 88, 87, 86	V4.BO.29	Abbildung 12 Seite 83
122-93-92-91	93, 92, 91, 89, 88, 86, 85	D'	Abbildung 12 Seite 83
122-93-90-89	93, 90, 89, 88, 87	V4.BP.16	Abbildung 13 Seite 84
122-92-91-86-85	92, 91, 89, 88, 86, 85	D	Abbildung 12 Seite 83
122-92-87-85	92, 91, 89, 87, 85	V4.MO.30	Abbildung 13 Seite 84
122-92-90-87	(94), 92, 90, 87, 86, (84)	V4.BE.23	Abbildung 12 Seite 83
122-92-89-87	(95), 92, (91), 89, (88), 87, 85, (83)	2	Abbildung 12 Seite 83
122-91-88-87	(96), (92), 91, 88, 87, (86)	N	Abbildung 12 Seite 83
122-90-88-87	90, 88, 87, partielle Hydrolyseleiter	N*	Abbildung 12 Seite 83
122-88	(89), 88, (86), (85)	J	Abbildung 13 Seite 84



### Elektrophoreserichtung >

Abbildung 12: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern der verschiedenen OTUs mit einer 5S rRNA Bande einer Größe von 122 nt, taxonomisch den Nocardioidea- und Clavibacter-Verwandten zuzuordnen. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: OTUs N (V4.ME.19), N' (V4.BE.17), N\* (V4.BO.13), V4.BE.23, D (V4.ME.27), D' (V4.MO.13), 2 (V4.BO.43), V4.BO.29. Normalisierte LMW - RNA Profile einzelner Isolate der OTUs siehe Abbildung 14, Seite 85.

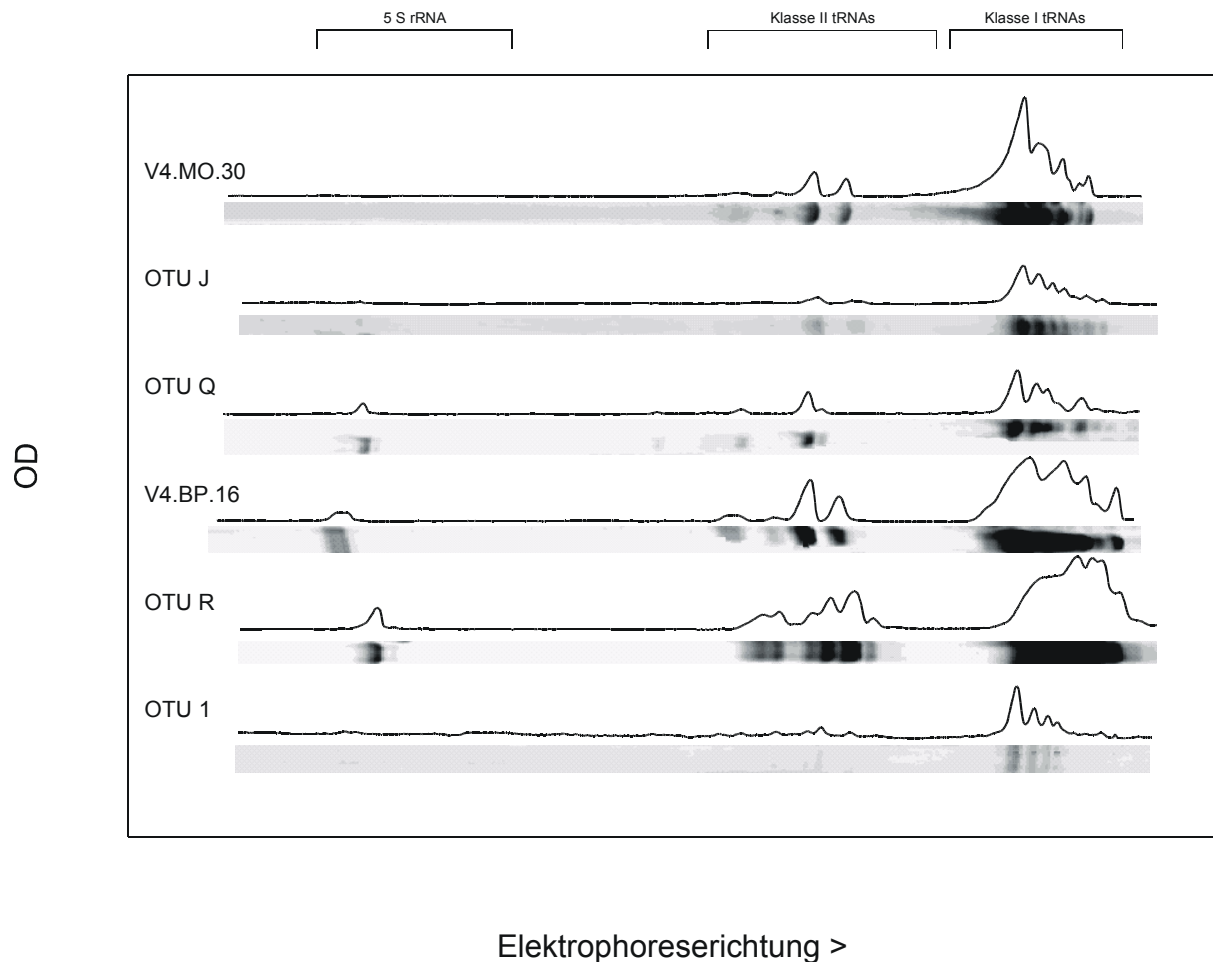


Abbildung 13: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern der verschiedenen OTUs mit einer 5S rRNA Bande einer Größe von 122 nt, taxonomisch den *Arthrobacter* / *Micrococcus* - Verwandten zuzuordnen. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: OTUs 1 (V4.BE.47), R (V4.BS.11), V4.BP.16, V4.MO.30, J (V4.MO20), Q (V4.BS.12). Normalisierte LMW - RNA - Profile einzelner Isolate siehe Abbildung 14, Seite 85.



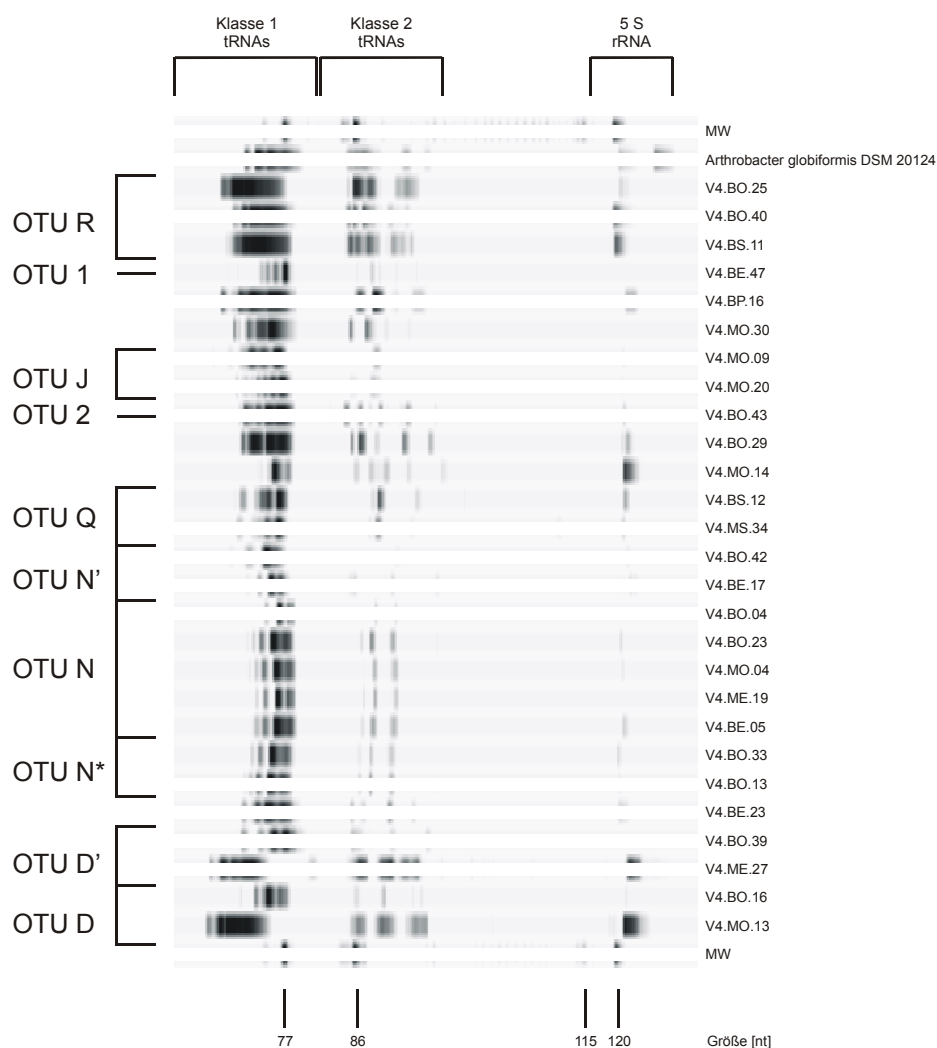


Abbildung 14: Normalisierte LMW - RNA Profile von Isolaten und Referenzstämmen mit einer 5S rRNA - Bande bei 122 und 121 nt. Alle Stämme sind taxonomisch den *Actinobacteria* zuzuordnen.

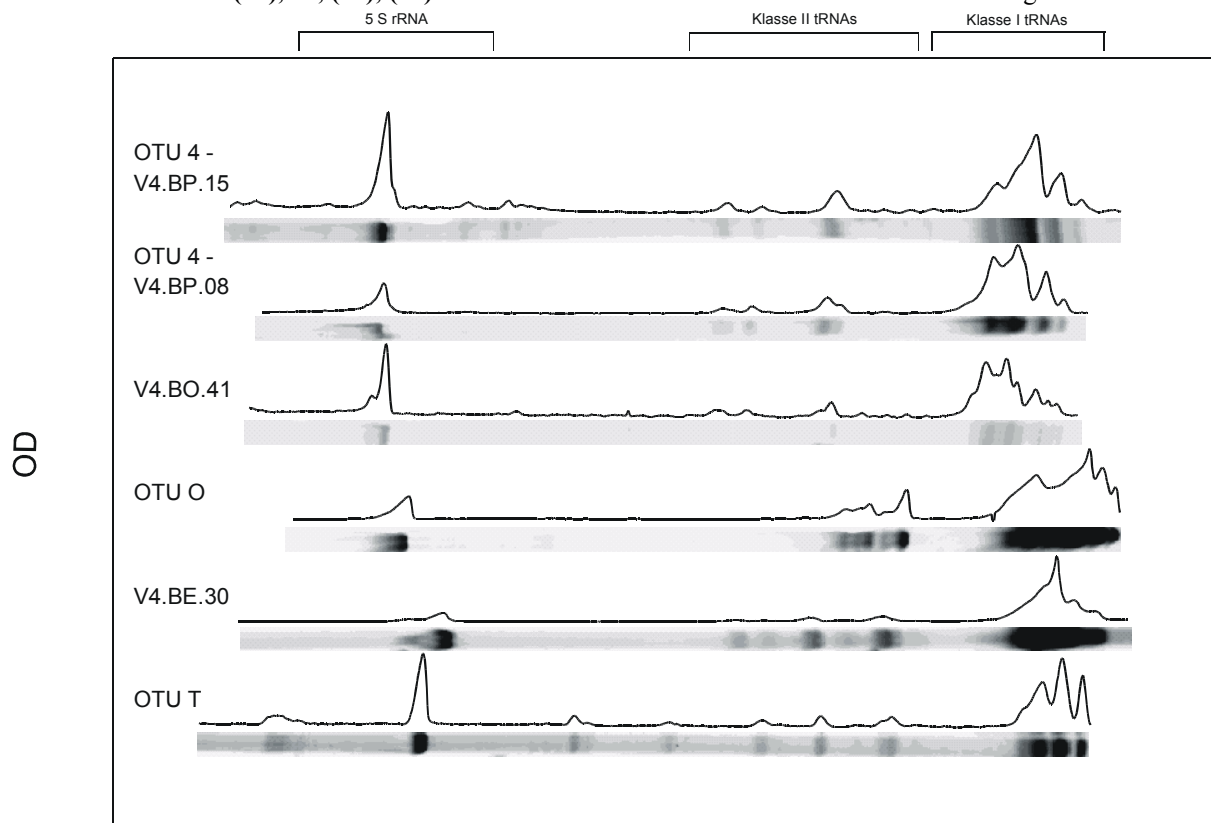
### 3.1.3.2.2.2 5S rRNA mit 121 nt Größe

**121-A:** 5S rRNA bei 121 oder 122 nt, nur eine Klasse II tRNA - Bande mit 88 nt erkennbar, sehr hoher Anteil an Klasse I tRNAs: Da bei einem hohen Anteil an Klasse I tRNAs der Anteil auf das Gel aufgetragener 5S rRNA und Klasse II tRNAs niedrig ist, können oft nur sehr starke Klasse II Banden in der Gelspur bestimmt werden. Die LMW - RNA Profiltypen J und Q besitzen jeweils eine starke Bande bei 88 nt, die oft als einzige Klasse II Bande des Profiles identifiziert wird. Zu prüfen ist, ob folgende Banden vorhanden sind: ① 89, 88, 86, 85 nt ② 98, 95 93, 89, 88 nt

Schlüssel	Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
121-89	①	J	Abbildung 13 Seite 84
121-98-95	②	Q	Abbildung 13 Seite 84
	sonstige	4, 5, V4.BO.41	121-B

**121-B:** Weitere Differenzierung nach Anzahl und Größe der Klasse II tRNAs (geordnet nach MW der jeweils größten, deutlich ausgeprägten Klasse II tRNA (%IntOD > 1%); schwache Banden mit einer %IntOD < 1% sind in Klammern aufgeführt)

Schlüssel	Größe der Klasse II tRNAs [nt]	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
121-98-92	<b>98, 92, 91, 88, 85, 84</b>	<b>5</b>	Abbildung 19 Seite 91
121-98-95	<b>98, 95, 93, 89, 88</b>	<b>Q</b>	Abbildung 13 Seite 84
121-95-94-92	<b>95, 94, 92, 87, 86</b>	<b>V4.BO.41</b>	Abbildung 15 Seite 86
121-95-94-92	<b>95, 94, 92, 87, 86</b>	<b>4 (V4.BP.08)</b>	Abbildung 15 Seite 86
121-94-92-87	<b>94, 92, 87, (86)</b>	<b>4 (V4.BP.15)</b>	Abbildung 15 Seite 86
121-88	<b>(89), 88, (86), (85)</b>	<b>J</b>	Abbildung 13 Seite 84



### Elektrophoreserichtung >

Abbildung 15: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern verschiedener OTUs. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: *Firmicutes* Niedrig – G+C: T (V4.BE.27), V4.BE.30; Fungi / Eukaryota: O (V4.BO.31);  $\gamma$  - Proteobakterien, *Stenotrophomonas sp.*: V4.BO.41, 4 (V4.BP.08) 4 (V4.BP.15). Normalisierte LMW - RNA Profile einzelner Isolate der OTUs siehe für OTUs O, T und V4.BE.30 Abbildung 16, Seite 80; für OTU 4 und V4.BO.41 Abbildung 18, Seite 80 sowie Abbildung 22, Seite 94.

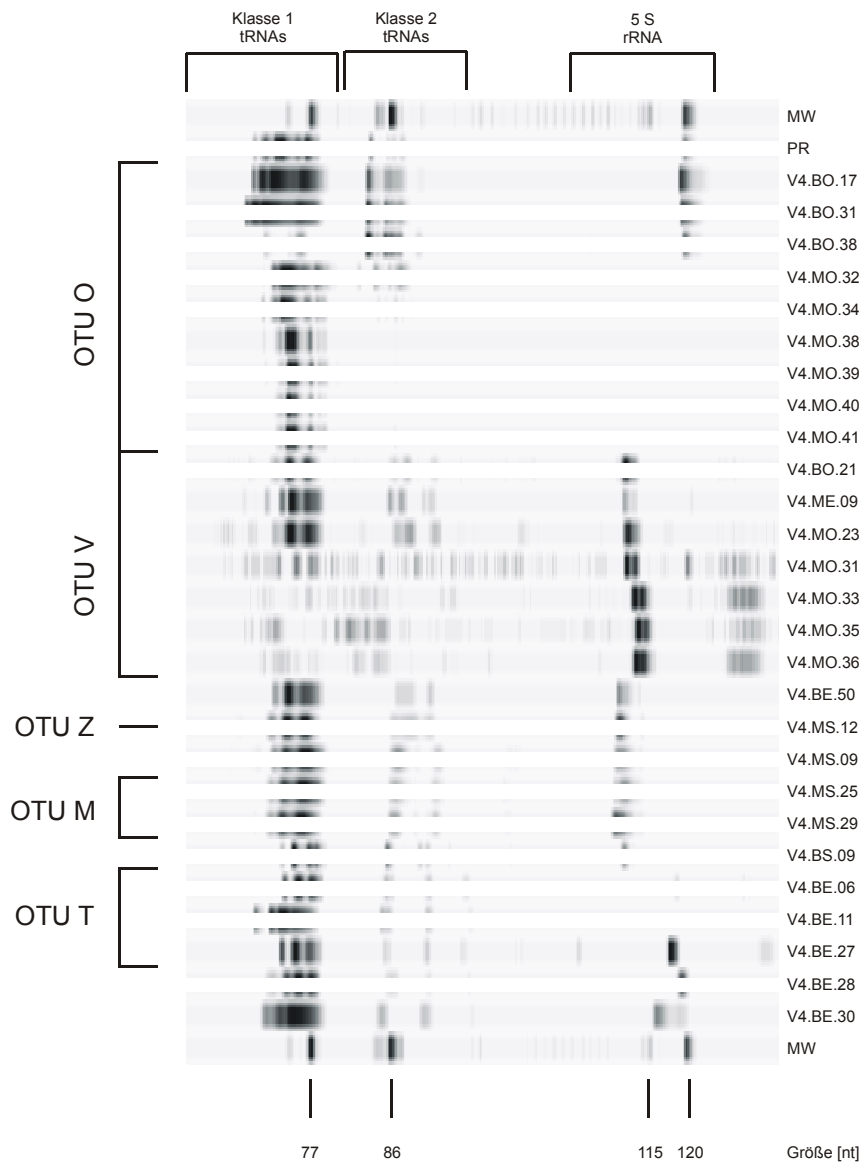


Abbildung 16: Normalisierte LMW - RNA Profile verschiedener Isolate und Referenzstämme. Die taxonomische Position der Isolate kann Tabelle 11 entnommen werden. OTU O wurde durch partielle Sequenzierung der 16S rRNA Gene bestätigt.

### 3.1.3.2.2.3 5S rRNA mit 120 nt Größe

**120-A: Vorhandensein der "Pseudomonas - Bande":** Unterhalb des Klasse I tRNA - Pools, der von zwei Banden bei 77 und 75 nt mit einer %IntOD von jeweils > 20 % dominiert wird (und fast nur aus diesen beiden Banden zu bestehen scheint) findet sich abgesetzt eine charakteristische Bande einer Größe von 71 nt ?

Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
<b>Ja</b>	<b>P, S</b>	120-B
<b>Nein</b>	<b>C, G, R, W, X</b>	120 C

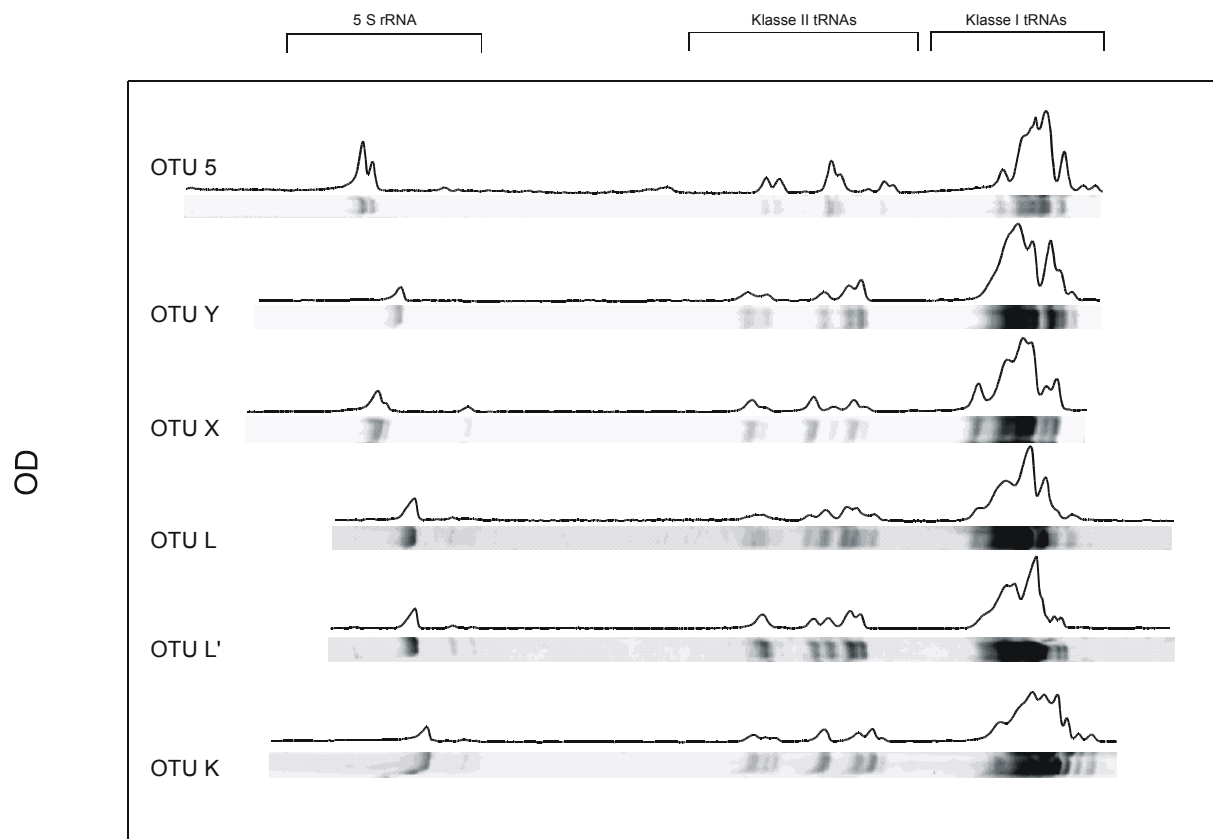
**120-B:** Differenzierung der OTUs P und S: ① Lediglich drei Klasse II tRNA Banden einer Größe von 91, 87 und 86 Banden oder ② Banden bei 91, 90, 88, 86, 85 nt sind vorhanden.

Schlüssel	Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
120-71-91-87	①	<b>P</b>	Abbildung 17 Seite 89
120-71-90-88	②	<b>S</b>	Abbildung 17 Seite 89

**120-C:** Weitere Differenzierung nach Anzahl und Größe der Klasse II tRNAs:

Schlüssel	Größe der Klasse II tRNAs [nt]	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
120-96-88	<b>96, 95, 93, 90, 89, 88, 86</b>	<b>C</b>	120-D; Abbildung 17 Seite 89
120-95-87	<b>95, 94, 92, 89, 88, 87, 86</b>	<b>W</b>	Abbildung 17 Seite 89
120-93-92	<b>93, 92, 91, 89, 87, 86, 85</b>	<b>R</b>	Abbildung 13 Seite 84
120-93-91	<b>93, 91, 88, 86</b>	<b>G</b>	Abbildung 17 Seite 89
120-92-91	<b>92, 91, 88, 86, 85</b>	<b>X</b>	Abbildung 19 Seite 91

**120-D:** Differenzierung der OTUs B und C: OTU C besitzt eine 5S rRNA einer Größe von 120 nt (mit einer %IntOD < 10 %) und 7 Klasse II tRNAs einer Größe von 96, 95, 93, 90, 89, 88, 86 nt. Differenzierung gegenüber der sehr ähnlichen OTU B: OTU B besitzt eine 5S rRNA Bande von  $118 \pm 1$  nt und 6 Klasse II tRNA - Banden. OTUs B und C siehe Abbildung 17, Seite 89



Elektrophoreserichtung >

Abbildung 17: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern der verschiedenen OTUs mit 5S rRNA Banden einer Größe von 120 nt (bzw. 118 nt für OTU B), taxonomisch der  $\gamma$  - Subklasse der Proteobakterien zuzuordnen. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: B (V4.BE.07), C (V4.MO.07), G (V4.BE.32), S (V4.BP.03), P (V4.MO.16), W (V4.MS.05). LMW - RNA Profile einzelner Isolate der OTUs siehe für OTU B Abbildung 21, Seite 93 und Abbildung 22, Seite 94; für OTU C Abbildung 18, Seite 91 und Abbildung 22, Seite 94, für OTUs G, S, P und W Abbildung 18, Seite 91.

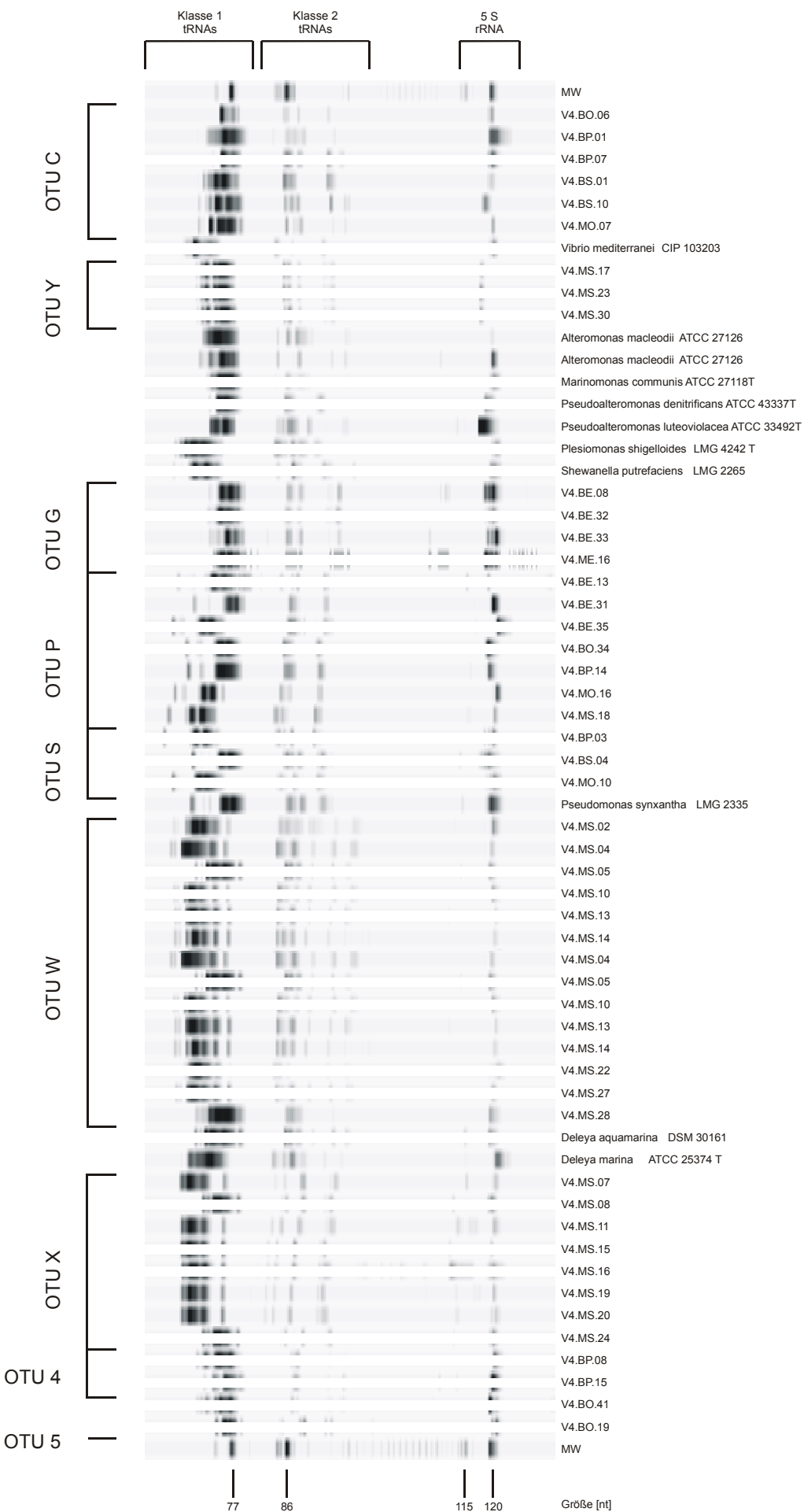


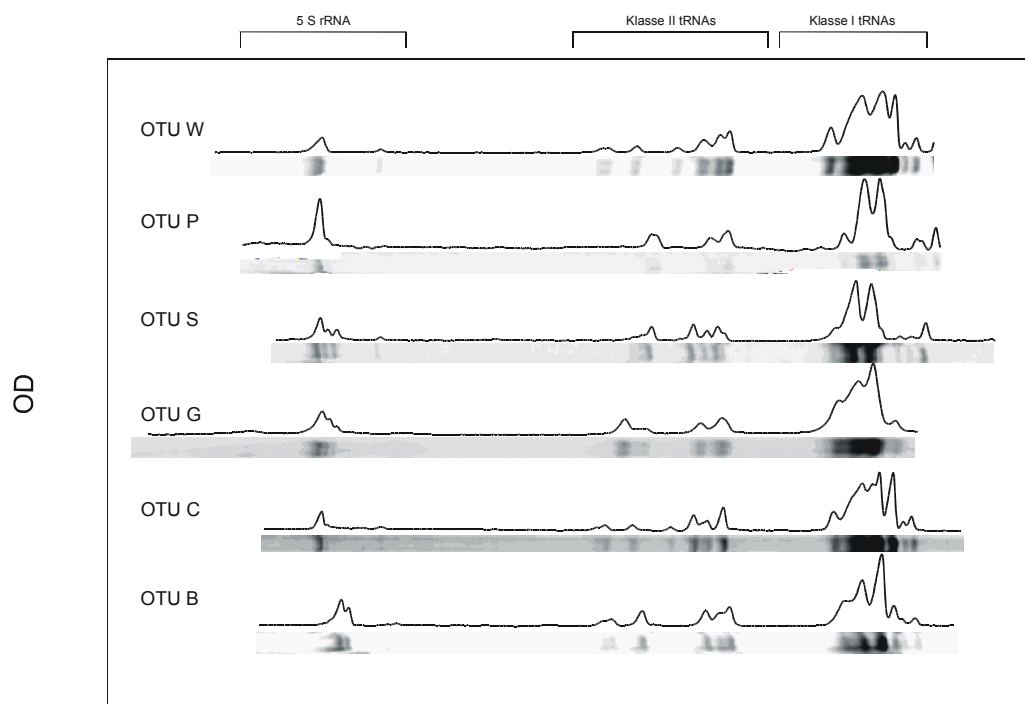
Abbildung 18 (Seite 90) : Normalisierte LMW - RNA Profile von Isolat und Referenzstämmen mit 5S rRNA - Banden einer Größe von 120 nt. Alle Stämme sind taxonomisch der  $\gamma$  - Subklasse der Proteobakterien zuzuordnen.

### 3.1.3.2.2.4 5S rRNA mit 118 nt Größe

**118-A:** Differenzierung nach Anzahl und Größe der Klasse II tRNAs (geordnet nach MW der jeweils größten, deutlich ausgeprägten Klasse II tRNA (%IntOD > 1%); schwache Banden mit einer %IntOD < 1% sind in Klammern aufgeführt)

Schlüssel	Größe der Klasse II tRNAs [nt]	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
118-106	<b>106, (105), 99, 93, 90, 87, 85, 84</b>	<b>T</b>	Abbildung 15 Seite 86
118-92-87-95	<b>95, 94, 92, 87, 86, 85</b>	<b>B</b>	Abbildung 17 Seite 89; 118-B
118-92-91-88	<b>92, 91, 88, 86, 85</b>	<b>Y</b>	Abbildung 19 Seite 91
140-118	<b>88, 87, 86, 85, 83</b>	<b>O</b>	Abbildung 15 Seite 86

**118-B:** Zur Differenzierung der OTUs B und C siehe Schlüssel 120-D



Elektrophoreserichtung >

Abbildung 19: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern der verschiedenen OTUs mit 5S rRNA Banden einer Größe von 120, bzw. 118 - 116 nt, taxonomisch der  $\gamma$  - Subklasse der Proteobakterien zuzuordnen. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: K (V4.BO.14), L' (V4.BS.03), L (V4.ME.25), X (V4.MS.24), Y (V4.MS.17), 5 (V4.BO.19). LMW - RNA Profile einzelner Isolate der OTUs siehe für OTUs X und 5 Abbildung 18, Seite 91, für OTUs K, L, L' und Y Abbildung 20, Seite 92.

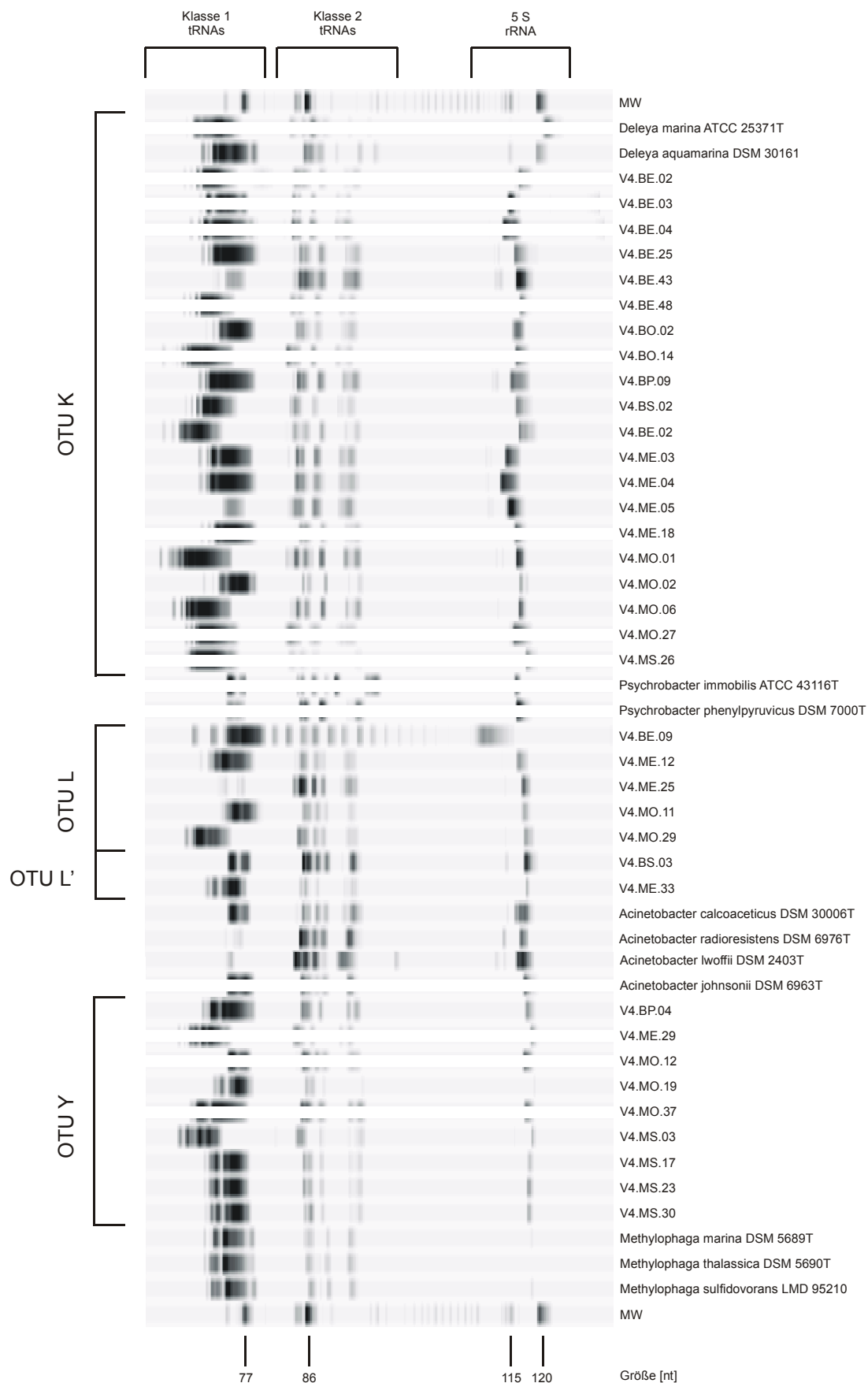


Abbildung 20: Normalisierte LMW - RNA Profile von Isolaten und Referenzstämmen mit 5S rRNA - Banden einer Größe von 118 nt. Alle Stämme sind taxonomisch der  $\gamma$  - Subklasse der Proteobakterien zuzuordnen.



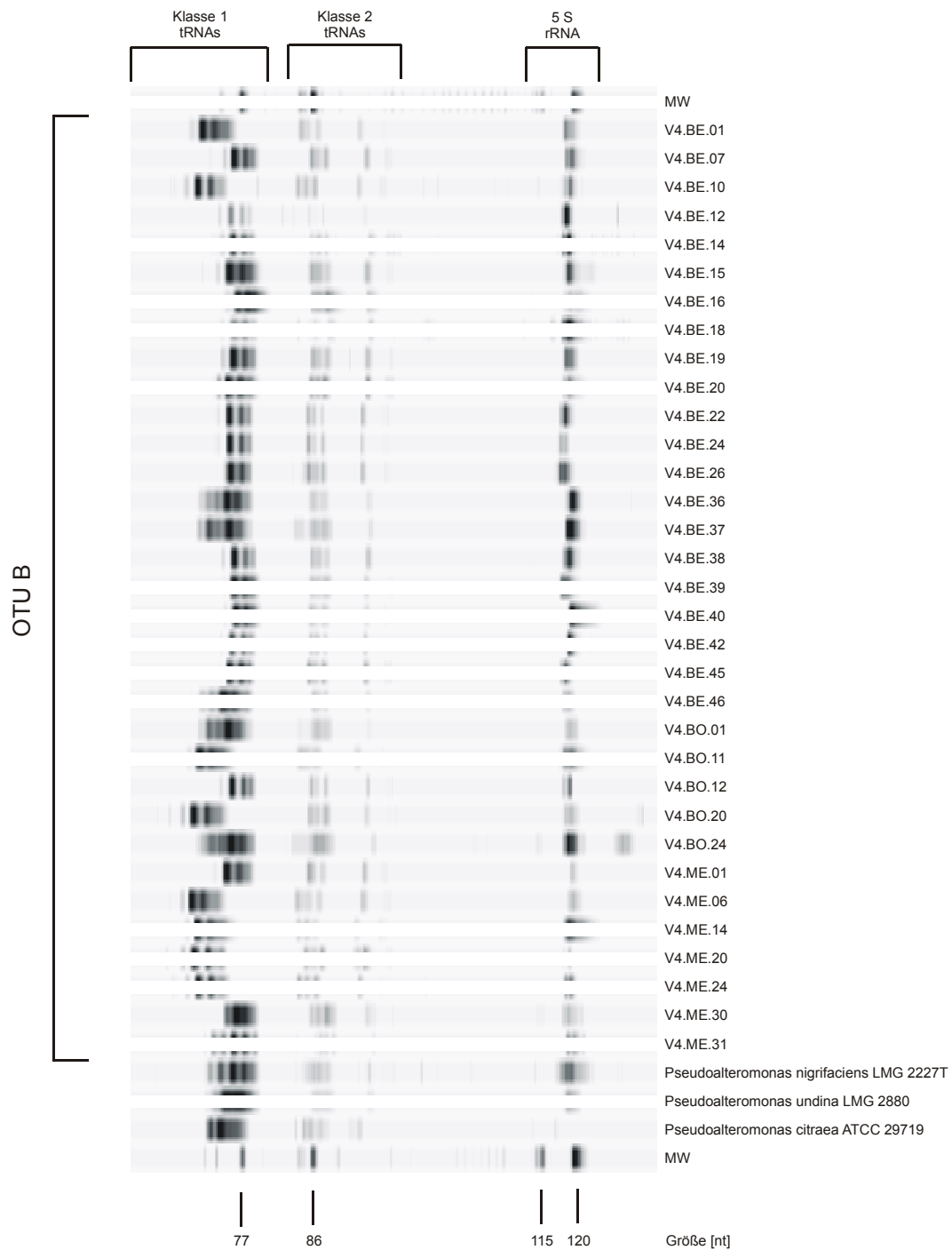


Abbildung 21: Normalisierte LMW - RNA Profile von Isolatzen der OTU B und von Referenzstämmen der Gattung *Pseudoalteromonas*.

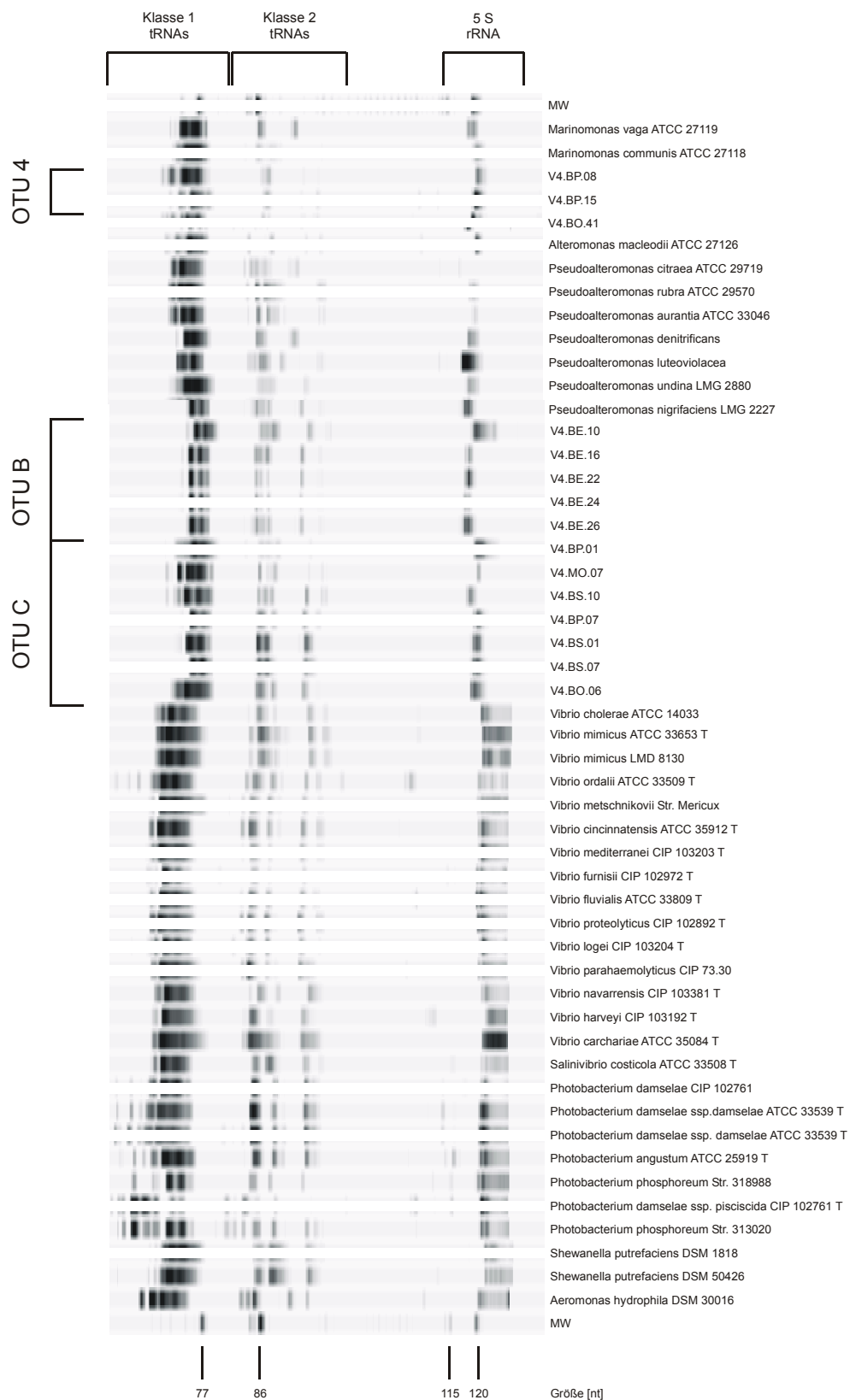


Abbildung 22: Normalisierte LMW - RNA Profile von Isolaten der OTUs B und C sowie von Referenzstämmen, die taxonomisch dem Genus *Vibrio* nahestehen.

### 3.1.3.2.2.5 5S rRNA mit 117 nt Größe

**117-A:** OTUs L, L': 5S rRNA - Bande bei 117 nt nebst zwei Fragmenten bei 114 und 112 nt mit einer %IntOD < 1 %. sowie Klasse II tRNA - Banden entweder ① bei 90, 87, 86, 85 und 84 nt oder ② zwei zusätzliche Banden; Klasse II tRNAs bei 91, 90, 87, 86, 85, 84 und 83 nt ?

Schlüssel	Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
117-90	①	L	Abbildung 19 Seite 91
117-91-83	②	L'	Abbildung 19 Seite 91

### 3.1.3.2.2.6 5S rRNA mit 116 nt Größe

**116-A:** ① 5S rRNA Bande bei 116 nt mit zwei schwachen Fragmenten einer %IntOD < 1 % bei 113 und 112 nt, mindestens 6 Klasse II tRNA - Banden sowie einer Bande unterhalb des tRNA - Pools bei 69 nt oder ② 5S rRNA Bande bei 116 nt, Klasse II tRNAs bei 94, 89, und 85 nt (neben weiteren, schwächer ausgeprägten Banden bei 92, 87 und 83 nt) sowie Klasse I tRNAs mit Größen zwischen 77 und 73 nt.

Schlüssel	Alternative	LMW - RNA OTU	Taxonomie	Siehe Abbildung
116-113-69	①	K	Psychrobacter sp.	Abbildung 19 Seite 91
116-94	②	V4.BE.30	Bacillus sp.	Abbildung 15 Seite 86

### 3.1.3.2.2.7 5S rRNA mit ≤ 115 nt Größe

Alle untersuchten Stämme mit 5S rRNAs einer Größe von unter 115 nt gehören zum Phylum Flavobakterium / Bacteroides.

**≤ 115-A:** 5S rRNA bei ① 114 bzw. 113 nt oder bei ② < 112 nt.

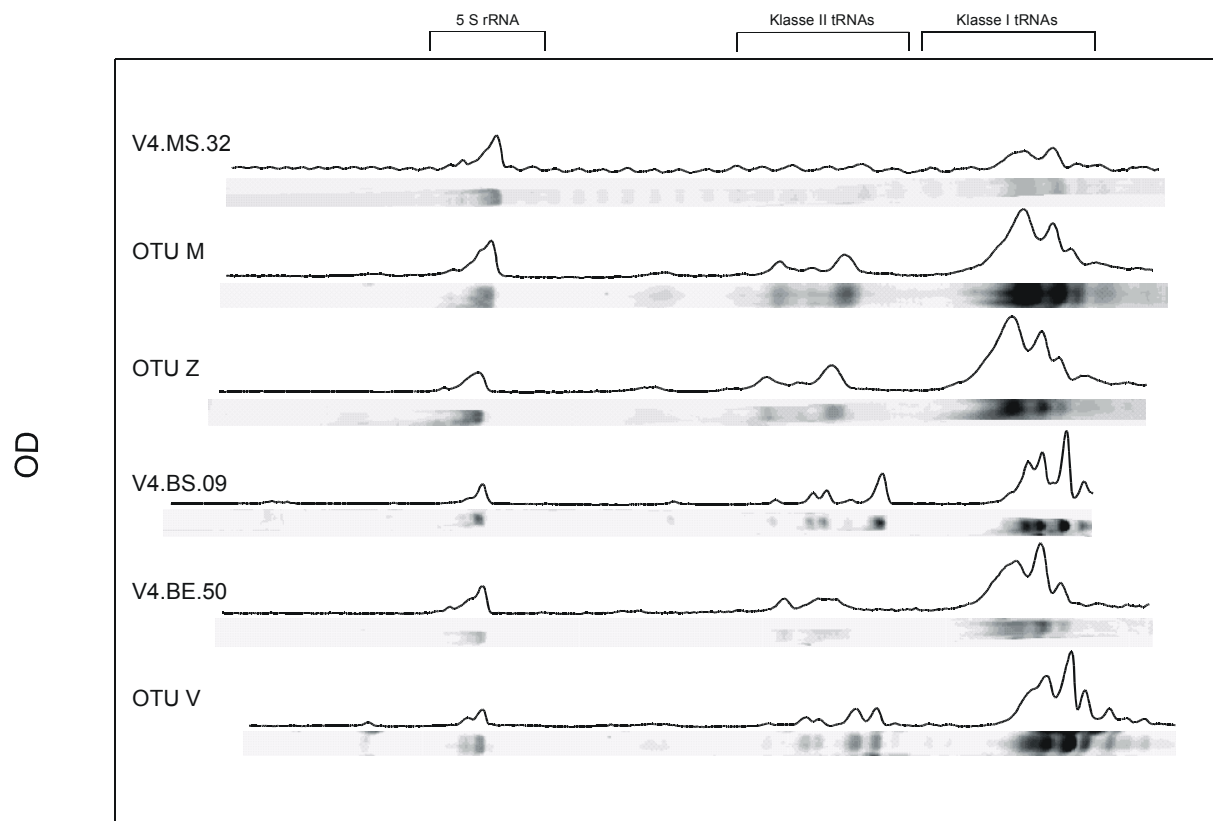
Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
①	V, Z	≤ 115-B
②	M	≤ 115-C

**≤ 115-B:** Klasse I tRNA bei 76 nt fehlt ("Lücke" im Kl. I tRNA - Pool) und ① 5S rRNA bei 114 nt, Klasse II tRNA bei 98 nt vorhanden, stark ausgeprägte Bande bei 86 nt oder ② 5S rRNA bei 113 / 112 nt, drei etwa gleich starke tRNA Banden bei 90, 87 und 86 nt

Schlüssel	Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abbildung
114-98	①	Z	Abbildung 23 Seite 96
113-90	②	V	Abbildung 23 Seite 96

≤ **115-C**: ① 5S rRNA bei 111 nt, Klasse II tRNAs bei 97, 90, 88 und 86 nt oder ② 5S rRNA bei 111 nt, Klasse II tRNAs bei 98, 92, 90, 88 und, stark ausgeprägt, 87 nt, Klasse I tRNA bei 76 nt fehlt ("Lücke" im Kl. I tRNA - Pool) oder ③ 5 S rRNA bei 112 / 110 nt , drei etwa gleichstarke Banden bei 89, 87 und 86 nt.

Schlüssel	Alternative	LMW - RNA OTU	Siehe Abschnitt
111-97-86	①	<b>M</b>	Abbildung 23 Seite 96
111-98-92-87	②	<b>V4.BS.09</b>	Abbildung 23 Seite 96
112-89	③	<b>V4.BE.50</b>	Abbildung 23 Seite 96



### Elektrophoreserichtung >

Abbildung 23: Nicht normalisierte LMW - RNA Profile von Vertretern der verschiedenen OTUs mit 5S rRNA Banden einer Größe von unter 115 nt, taxonomisch dem *Flavobacterium* / *Bacteroides* - Phylum zuzuordnen. Die Größen (Nucleotidanzahl [nt]) der einzelnen Banden können Tabelle 10 entnommen werden. LMW - RNA Profile sind in der Abbildung so angeordnet, daß die 120 nt - Positionen übereinstimmen, alle übrigen Positionen sind nicht skaliert. Auf der Abszisse ist die Laufstrecke der RNAs aufgetragen, die Laufrichtung der Moleküle im elektrischen Feld wird durch das Zeichen > bezeichnet. Isolate: V (V4.ME.09), V4.BE.50, V4.BS.09, Z (V4.MS.09), M (V4.MS.29), V4.MS.32. Normalisierte LMW - RNA Profile einzelner Isolate der OTUs siehe Abbildung 16, Seite 80.

### 3.1.4 Sequenzierung der 16S rRNA - Gene

Die taxonomischen Verwandtschaftsverhältnisse einzelner Vertreter der LMW – RNA – OTUs sowie alle nicht einer LMW - RNA OTU zuordenbaren Isolate wurden durch Sequenzierung der jeweiligen 16S rRNA Gene bestimmt. Zu klären waren folgende Fragen:

- Ist die vorgenommene Gruppierung anhand von LMW – RNA Profildaten konsistent mit 16S rRNA Daten ?
- Welche Unterschiede auf 16S Sequenzebene besitzen Isolate mit ① als identisch erachteten oder ② ähnlichen (in einer oder zwei tRNA - Banden unterschiedlichen) LMW – RNA – Profilen ?
- Wie unterscheiden sich Isolate, deren LMW – RNA Profile unterschiedlich zu den LMW – RNA Profilen aller anderen Isolate waren, hinsichtlich ihrer taxonomischen Positionen ?
- Welche taxonomischen Positionen besitzen Isolate, deren LMW – RNA Profile aufgrund schlechter Qualität keine Zuordnung zu bestehenden LMW – RNA OTUs erlaubten ?

Um in die weitere Auswertung auch Isolate einzubeziehen, die aufgrund von LMW – RNA – Profilen nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wird der OTU – Begriff erweitert: Im Unterschied zu LMW – RNA OTUs (Isolate, deren LMW – RNA Profile als identisch klassifiziert wurden) wird im Folgenden eine OTU wie folgt definiert: Eine OTU umfaßt alle Mitglieder einer LMW – RNA OTU und alle Isolate, deren 16S rRNA Gensequenz nicht mehr als 2 % Unterschied zu allen übrigen Mitgliedern einer OTU aufweist, sofern sie sich nicht in ihren LMW – RNA Profilen unterscheiden.

Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.BE.01	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	5	1995-04-06
V4.BE.02	K		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	5	1995-04-06
V4.BE.03	K	<i>Psychrobacter glacinicola like sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	5	1995-04-06
V4.BE.04	K	<i>Psychrobacter glacinicola like sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	5	1995-04-06
V4.BE.05	N	<i>Nocardioides medit. group N</i> *	Actinobacteria	MB	S 1	R	90	1995-04-06
V4.BE.06	T	<i>Bacillus sp.</i> <sup>T</sup>	Firmicutes Niedrig-G+C	MB	S 1	G	90	1995-04-06
V4.BE.07	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	90	1995-04-06
V4.BE.08	G		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	130	1995-04-06
V4.BE.09	L	<i>Acinetobacter sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	130	1995-04-06
V4.BE.10	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	130	1995-04-06
V4.BE.11	T	<i>Bacillus sp.</i> *	Firmicutes Niedrig-G+C	MB	S 1	F	280	1995-04-06
V4.BE.12	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	280	1995-04-06
V4.BE.13	P		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	400	1995-04-06
V4.BE.14	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	400	1995-04-06
V4.BE.15	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	R	400	1995-04-06
V4.BE.16	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	600	1995-04-06
V4.BE.17	N'	<i>Nocardioides like sp.</i> <sup>T*</sup>	Actinobacteria	MB	S 1	R	600	1995-04-06

Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.BE.18	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.19	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.20	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.21	2	<i>Janibacter sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.22	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.23	nd	<i>Dietzia maris like sp. *</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.24	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.25	K		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.26	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.27	T	<i>Bacillus sp. *</i>	<i>Firmicutes</i> Niedrig-G+C	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.28	nd	<i>Bacillus sp. *</i>	<i>Firmicutes</i> Niedrig-G+C	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.29	X	<i>Marinobacter sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.30	nd	<i>Bacillus cereus like sp. *</i>	<i>Firmicutes</i> Niedrig-G+C	MB	S 1	G	320	1995-03-31
V4.BE.31	P	<i>Pseudomonas stutzeri like sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	460	1995-04-09
V4.BE.32	G	<i>Alteromonas macleodii like sp. T</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	460	1995-04-09
V4.BE.33	G	<i>Alteromonas macleodii like sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	460	1995-04-09
V4.BE.34	B	<i>Pseudoalteromonas sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	460	1995-04-09
V4.BE.35	P		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	460	1995-04-09
V4.BE.36	B	<i>Pseudoalteromonas sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	660	1995-04-09
V4.BE.37	B	<i>Pseudoalteromonas sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	660	1995-04-09
V4.BE.38	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	90	1995-04-07
V4.BE.39	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	140	1995-04-07
V4.BE.40	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	140	1995-04-07
V4.BE.41	A	<i>Sphingomonas / Erythrobacter like sp. *</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 1	F	140	1995-04-07
V4.BE.42	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	420	1995-04-07
V4.BE.43	K		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	420	1995-04-07
V4.BE.45	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	140	1995-04-07
V4.BE.46	B	<i>Pseudoalteromonas sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	G	420	1995-04-07
V4.BE.47	l	<i>Arthrobacter crystallopoites like sp. T*</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	G	420	1995-04-07
V4.BE.48	K		Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	700	1995-04-07
V4.BE.49	H	<i>Brevundimonas mediterranea group H</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 1	G	700	1995-04-07
V4.BE.50	nd	<i>Flavobacterium salegenes like sp.</i>	Bact. – Flavobacterium	MB	S 1	G	700	1995-04-07
V4.BE.51	nd	<i>Corynebacterium aquaticum like sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	R	130	1995-04-06
V4.BE.52	l	<i>Arthrobacter crystallopoites like sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	F	400	1995-04-06
V4.BE.53	nd	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	G	360	1995-04-09
V4.BE.54	N	<i>Nocardioides mediterranea group N*</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 1	G	200	1995-04-09
V4.BE.55	K	<i>Psychrobacter sp. *</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 1	F	700	1995-04-07
V4.BE.56	H	<i>Brevundimonas mediterranea group H</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 1	G	280	1995-04-06
V4.BO.01	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	5	1995-04-03

Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.BO.02	K		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	5	1995-04-03
V4.BO.03	A	<i>Sphingomonas / Erythrobacter like sp.</i> <sup>T</sup>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	5	1995-04-03
V4.BO.04	N		<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	90	1995-04-03
V4.BO.05	H'	<i>Brevundimonas vesicularis like sp.</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	80	1995-04-03
V4.BO.06	C	<i>Vibrio sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	110	1995-04-03
V4.BO.07	H'	<i>Brevundimonas vesicularis like sp.</i> <sup>T</sup>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	110	1995-04-03
V4.BO.08	3	<i>Staphylococcus sp.</i> <sup>*</sup>	<i>Firmicutes</i> Niedrig-G+C	MB	S 2	G	110	1995-04-03
V4.BO.09	nd	<i>Caulobacter sp.</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	110	1995-04-03
V4.BO.10	H	<i>Brevundimonas medit. group H</i> <sup>T</sup>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	150	1995-04-03
V4.BO.11	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	150	1995-04-03
V4.BO.12	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	400	1995-04-03
V4.BO.13	N*		<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	90	1995-04-03
V4.BO.14	K	<i>Psychrobacter glacinicola like sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	80	1995-04-03
V4.BO.15	N*	<i>Nocardioides medit. group N</i> <sup>T*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	80	1995-04-03
V4.BO.16	D'	<i>Rhodococcus sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	80	1995-04-03
V4.BO.17	O	<i>Rhodotorula sp.</i> <sup>*</sup>	Fungi, Eukaryota	MB	S 2	R	90	1995-04-03
V4.BO.18	H	<i>Brevundimonas medit. group H</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	R	90	1995-04-03
V4.BO.19	5	<i>Alcanivorax like sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	90	1995-04-03
V4.BO.20	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	F	400	1995-04-03
V4.BO.21	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i>	Bact. – Flavobacterium	MB	S 2	F	400	1995-04-03
V4.BO.22	H	<i>Brevundimonas medit. group H</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	F	150	1995-04-03
V4.BO.23	N		<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	F	90	1995-04-03
V4.BO.24	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.25	R		<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.26	nd	<i>Corynebacterium aquaticum like sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.27	H	<i>Brevundimonas medit. group H</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.28	nd	<i>Terrabacter sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.29	nd	<i>Clavibacter sp.</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.30	B		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	400	1995-04-03
V4.BO.31	O	<i>Rhodotorula sp.</i> <sup>T*</sup>	Fungi, Eukaryota	MB	S 2	G	260	1995-04-03
V4.BO.32	A		Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	G	80	1995-04-03
V4.BO.33	N*	<i>Nocardioides medit. group N</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	80	1995-04-03
V4.BO.34	P		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	110	1995-04-03
V4.BO.35	G	<i>Alteromonas macleodii like sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	F	5	1995-04-03
V4.BO.38	O		Fungi, Eukaryota	MB	S 2	R	90	1995-04-03
V4.BO.39	D		<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	90	1995-04-03
V4.BO.40	R	<i>Arthrobacter medit. group R</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	300	1995-04-02
V4.BO.41	nd	<i>Xanthomonas like sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.42	N'	<i>Nocardioides like sp.</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	600	1995-04-02

Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.BO.43	2	<i>Janibacter sp.</i> <sup>T</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	600	1995-04-02
V4.BO.47	nd	<i>Microbacterium sp.</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	G	400	1995-04-08
V4.BP.01	C	<i>Vibrio sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.02	A		Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.03	S	<i>Pseudomonas synxantha like sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.04	Y		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.05	H*	<i>Mycoplana bullata like sp.</i> <sup>T</sup>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.06	3	<i>Staphylococcus sp.</i> <sup>T</sup>	<i>Firmicutes</i> Niedrig-G+C	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.07	C	<i>Vibrio sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.08	4	<i>Stenotrophomonas maltophilia like sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.09	K		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.10	nd	<i>Roseobacter like sp.</i>	Alpha – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.11	nd	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.12	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.13	C	<i>Vibrio sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.14	P		Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.15	4	<i>Stenotrophomonas maltophilia like sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BP.16	nd	<i>Micrococcus lylae like sp.</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	S 2	R	30	1995-04-03
V4.BS.01	C		Gamma – Proteobakterien	MB	P B	R	40	1995-04-01
V4.BS.02	K		Gamma – Proteobakterien	MB	P B	R	40	1995-04-01
V4.BS.03	L'	<i>Acinetobacter sp.</i> <sup>T*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	P B	R	40	1995-04-01
V4.BS.04	S		Gamma – Proteobakterien	MB	P B	R	40	1995-04-01
V4.BS.06	A	<i>Sphingomonas / Erythrobacter like sp.</i> <sup>*</sup>	Alpha – Proteobakterien	MB	P B	R	10	1995-04-01
V4.BS.07	C		Gamma – Proteobakterien	MB	P B	R	10	1995-04-01
V4.BS.09	nd	<i>Flavobacterium sp.</i>	Bact. – Flavobacterium	MB	P B	F	3	1995-04-01
V4.BS.10	C	<i>Vibrio sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	MB	P B	F	3	1995-04-01
V4.BS.11	R	<i>Arthrobacter medit. group R</i> <sup>T</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	P B	G	10	1995-04-01
V4.BS.12	Q	<i>Dermatophilus like sp.</i> <sup>T</sup>	<i>Actinobacteria</i>	MB	P B	R	10	1995-04-01
V4.ME.01	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.03	K		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.04	K		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.05	K		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.06	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.07	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	90	1995-04-06
V4.ME.08	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	280	1995-04-06
V4.ME.09	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i> <sup>T</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	S 1	G	400	1995-04-06
V4.ME.10	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	400	1995-04-06
V4.ME.11	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	400	1995-04-06
V4.ME.12	L		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	400	1995-04-06



Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.ME.13	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	400	1995-04-06
V4.ME.14	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	600	1995-04-06
V4.ME.15	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.16	G	<i>Alteromonas macleodii</i> like sp.	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	5	1995-04-06
V4.ME.18	K	<i>Psychrobacter glacinicola</i> like sp. *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	90	1995-04-06
V4.ME.19	N	<i>Nocardioides medit. group N<sup>T</sup></i>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 1	G	90	1995-04-06
V4.ME.20	B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	F	90	1995-04-06
V4.ME.22	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	F	130	1995-04-06
V4.ME.23	nd	<i>Roseobacter</i> like sp.	Alpha – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	R	130	1995-04-06
V4.ME.24	B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	F	280	1995-04-06
V4.ME.25	L	<i>Acinetobacter</i> sp. <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	R	280	1995-04-06
V4.ME.26	B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	400	1995-04-06
V4.ME.27	D	<i>Rhodococcus</i> sp. <sup>T*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 1	F	400	1995-04-06
V4.ME.28	B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	R	400	1995-04-06
V4.ME.29	Y	<i>Methylophaga</i> sp.	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	R	400	1995-04-06
V4.ME.30	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	600	1995-04-06
V4.ME.31	B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	G	600	1995-04-06
V4.ME.33	L'		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	R	600	1995-04-06
V4.ME.34	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 1	F	600	1995-04-06
V4.MO.01	K		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	5	1995-04-03
V4.MO.02	K		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	5	1995-04-03
V4.MO.03	nd	<i>Ustilago</i> sp.	Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	5	1995-04-03
V4.MO.04	N	<i>Nocardioides medit. group N<sup>*</sup></i>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	G	80	1995-04-03
V4.MO.05	F	<i>Mesorhizobium</i> like sp. *	Alpha – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	110	1995-04-03
V4.MO.06	K		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	110	1995-04-03
V4.MO.07	C		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	80	1995-04-03
V4.MO.08	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	400	1995-04-03
V4.MO.09	J	<i>Micrococcus lylae</i> like sp. <sup>T*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	G	400	1995-04-03
V4.MO.10	S		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	5	1995-04-03
V4.MO.11	L		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	5	1995-04-03
V4.MO.12	Y		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	5	1995-04-03
V4.MO.13	D'	<i>Rhodococcus</i> sp. <sup>T*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	R	80	1995-04-03
V4.MO.14	nd	<i>Agrococcus</i> sp.	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	R	80	1995-04-03
V4.MO.15	A	<i>Sphingomonas</i> / <i>Erythrobacter</i> like sp. *	Alpha – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	80	1995-04-03
V4.MO.16	P	<i>Pseudomonas stutzeri</i> like sp. <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	110	1995-04-03
V4.MO.17	F	<i>Mesorhizobium</i> like sp.	Alpha – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	110	1995-04-03
V4.MO.18	F		Alpha – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	110	1995-04-03
V4.MO.19	Y	<i>Methylophaga</i> sp.	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	150	1995-04-03
V4.MO.20	J	<i>Micrococcus lylae</i> like sp. *	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	F	400	1995-04-03

Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.MO.21	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	F	400	1995-04-03
V4.MO.22	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	F	260	1995-04-03
V4.MO.23	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i> <sup>*</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	S 2	F	260	1995-04-03
V4.MO.24	C		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	150	1995-04-03
V4.MO.25	B	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	F	150	1995-04-03
V4.MO.26	F	<i>Mesohizobium like sp.</i> <sup>T</sup>	Alpha – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	F	110	1995-04-03
V4.MO.27	K	<i>Psychrobacter glacinicola like sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	F	5	1995-04-03
V4.MO.28	B		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	F	5	1995-04-03
V4.MO.29	L	<i>Acinetobacter sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	R	5	1995-04-03
V4.MO.30	nd	<i>Micrococcus lylae like sp.</i>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	G	80	1995-04-03
V4.MO.31	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.32	O	<i>Rhodotorula sp.</i> <sup>*</sup>	Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.33	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i> <sup>*</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.34	O	<i>Rhodotorula sp.</i>	Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.35	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i> <sup>*</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.36	V	<i>Flavobacterium medit. group V</i> <sup>*</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.37	Y		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.38	O		Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.39	O		Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.40	O		Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.41	O		Fungi, Eukaryota	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.42	nd	<i>Microbacterium sp.</i> <sup>*</sup>	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MO.43	5	<i>Alcanivorax like sp.</i> <sup>*</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	S 2	G	600	1995-04-02
V4.MS.02	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.03	Y		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.04	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.05	W	<i>Deleya aquamarina like sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.07	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.08	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.09	Z		Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.10	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.11	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.12	Z	<i>Cytophaga marinoflava like sp.</i> <sup>T</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	P B	F	40	1995-04-01
V4.MS.13	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	F	40	1995-04-01
V4.MS.14	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.15	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.16	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.17	Y	<i>Methylophaga sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.18	P		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01

Isolat	OTU	nächster phylogenetischer Verwandter nach 16S rRNA – Gensequenz	Phylogenetische Position	Isolations- medium	Station	Fraktion	Tiefe [m]	Datum d. Proben- nahme
V4.MS.19	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01
V4.MS.20	X		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01
V4.MS.21	X	<i>Marinobacter sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01
V4.MS.22	W	<i>Deleya aquamarina like sp.</i> *	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.23	Y		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.24	X	<i>Marinobacter sp.</i> <sup>T</sup>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.25	M	<i>Flavobacterium medit. group M</i> <sup>T</sup>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.26	K	<i>Psychrobacter sp.</i>	Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.27	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.28	W		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.29	M	<i>Flavobacterium medit. group M</i>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	P B	F	40	1995-04-01
V4.MS.30	Y		Gamma – Proteobakterien	NMS+MeOH	P B	R	40	1995-04-01
V4.MS.32	nd	<i>Cyclobacterium like sp.</i>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01
V4.MS.33	M	<i>Flavobacterium medit. group M</i>	Bact. – Flavobacterium	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01
V4.MS.34	Q	<i>Dermatophilus like sp.</i> *	<i>Actinobacteria</i>	NMS+MeOH	P B	G	40	1995-04-01

Tabelle 11: Charakterisierung aller Isolate anhand von LMW - RNA Profilen und 16S RNA - Sequenzierung. Aufgeführt sind das Isolationsmedium (MB, Marine Broth; NMS + MeOH, Nutrient Mineral Salts + Methanol); Station der Probennahme (S 1, Station 1; S 2, Station 2; P B, Punkt B); Fraktion der Probe, aus welcher der Stamm isoliert wurde (G, gesamt aus unbehandelter Wasserprobe; F, Filtrat (< 1 µm); R, Retentat (> 1 µm); Wassertiefe, aus der die Probe entnommen wurde, sowie dem Datum der Probennahme im Format Jahr-Monat-Tag. Abkürzungen: Bact. Bacteroides, medit. mediterranen; nd, OTU ist nur durch ein einziges Isolat vertreten; <sup>T</sup>, Typstamm der OTU; \*, das 16S rRNA Gen des Isolates wurde lediglich partiell sequenziert, der sequenzierte Bereich entspricht in etwa den *E. coli* homologen Positionen 500 bis 100. Das Feld 16S Sequenz ist nur ausgefüllt, wenn das 16S rRNA - Gen des betreffenden Stammes analysiert wurde.

### 3.1.5 16S rRNA-Gen Sequenzen

Bezogen auf die Sequenz ihrer 16S rRNA - Gene, wiesen die Mitglieder einer LMW – RNA OTU maximal 3 % Sequenzunterschiede auf. Insgesamt konnten alle Isolate bekannten taxonomischen Gruppen zugeordnet werden. Diese Taxa waren: Alpha- und Gamma – Proteobakterien, *Flavobacterium* / *Cytophaga* / *Bacteroides*, *Actinobacteria* und die *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt.

### 3.1.5.1 Gruppierung von 16 S rRNA-Gensequenzen

#### 3.1.5.1.1 Taxon Alpha – Proteobakterien

Den Alpha – Proteobakterien waren die LMW – RNA OTUs A , F, H, H', H\* sowie zwei Isolate aus der Rhodobacter – Assemblage zuzuordnen. Die ermittelten taxonomischen Verwandtschaftsverhältnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Zur  $\alpha$  - 4 Unterklasse der Proteobakterien gehörten die OTUs A (*Erythrobacter* like sp.). Die 16S rRNA – Gensequenzen der OTUs H, H' und H\*, die sich in ihren LMW – RNA Profilen voneinander nur durch eine bzw. zwei Bandenpositionen voneinander unterschieden, gruppieren alle im Genus *Brevundimonas*. Dort bildeten sie drei deutlich voneinander zu unterscheidende Gruppen, die der aus LMW – RNA Profilanalyse abgeleiteten Gruppierung entsprach. OTU F unterschied sich hinsichtlich der 16S rRNA – Gensequenz deutlich von bisher beschriebenen Genera, die nächst verwandten, gültig beschriebenen Stämme waren *Mesorhizobium tianshinense* mit 94 % und *Mycoplana dimorpha* mit 93 % identischen Positionen des 16S rRNA Gens. Allerdings zeigten die Sequenzen von OTU F eine Sequenzähnlichkeit von mehr als 99 % mit einem Mangan – oxidierenden Bakterium, Stamm S185-9A1 (Caspi, Haygood & Tebo, 1996).

#### 3.1.5.1.2 Taxon Gamma – Proteobakterien

Die LMW – RNA OTUs der innerhalb der Gamma – Proteobakterien gruppierenden Isolate ließ sich zum großen Teil bekannten Genera zuordnen, die in marinen Habitaten regelmäßig gefunden werden können: OTU B zu *Pseudoalteromonas*, C zu *Vibrio*, G zu *Alteromonas*, K zu *Psychrobacter*, L und L' zu *Acinetobacter*, P und S zu *Pseudomonas*, X zu *Marinobacter*, Y zu *Methylophaga* und 4 zu *Stenotrophomonas*. Möglicherweise repräsentiert OTU 5 eine eigene Gattung. Die Isolate von OTU 5 standen phylogenetisch alkanoxidierenden, Biosurfactant – produzierenden Bakterien, die zum Genus *Alcanivorax* gehören, nahe. Das Substratspektrum dieser Organismen (im BIOLOG - Test wurden tween40, tween80 und Propionat als einzige verwertete C - Quellen bestimmt) zeigte, daß auch physiologisch eine nahe Verwandtschaft zu diesem Taxon zu bestehen schien. OTU 4 stand dem Genus *Stenotrophomonas* nahe, das Isolat V4.BO.41 war phylogenetisch nahe verwandt zu den Genera *Stenotrophomonas* und *Xanthomonas*, ließ sich aber von OTU 4 anhand von LMW – RNA Profilen und einer Sequenzidentität von lediglich 96,5 % unterscheiden. Eine Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse in Form eines Dendrogrammes findet sich in Abbildung 25.

Abbildung 24 (Seite 105): Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse von isolierten Alpha-Proteobakterien zu ausgewählten Referenzstämmen aufgrund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA Gene. Angegeben sind Name der Spezies bzw. des Stammes, Genbank Accession Nr. sowie bei Isolaten Station, Tiefe und Fraktion. Die Nomenklatur der Isolate ist erläutert in Abschnitt 69. Isolate aus dieser Untersuchung sind durch rote, fett und kursiv gesetzte Schrift optisch hervorgehoben. Sequenzen von molekularen Klonen, die im Verlauf von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Probenmaterial vom Standort Villefrance s. M. erhalten wurden (Ruimy *et al.*, 1997) (grüne Beschriftung), (Giuliano *et al.*, 1999) (gelbe Beschriftung), sind durch Pfeile markiert. Weitere Erläuterungen siehe auch Abbildung 41.

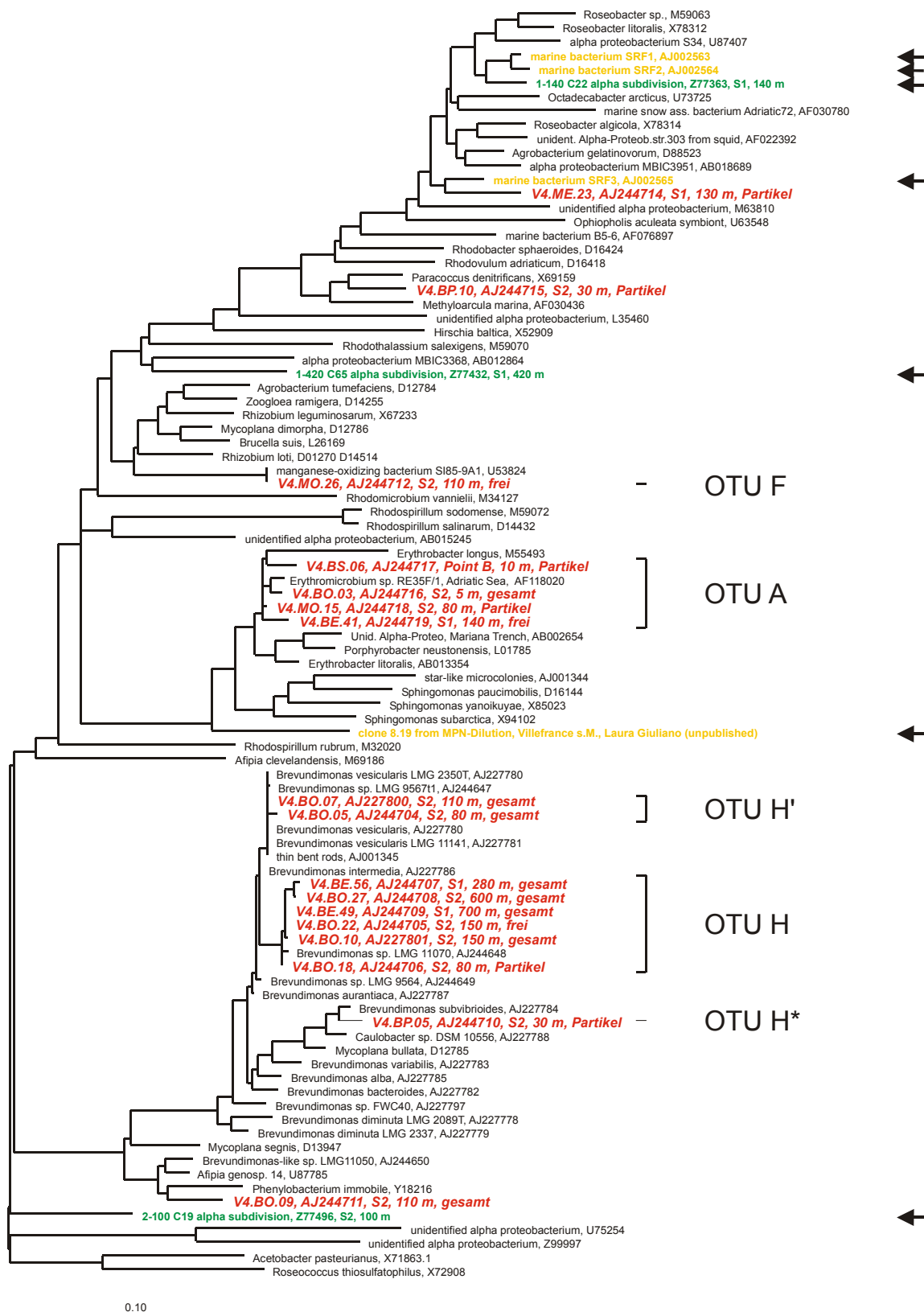




Abbildung 25 (Seite 106): Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse von isolierten Gamma-Proteobakterien zu ausgewählten Referenzstämmen aufgrund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA Gene. Sequenzen von molekularen Klonen, die im Verlauf von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Probenmaterial vom Standort Villefrance s. M. erhalten wurden (Giuliano *et al.*, 1999), sind durch Pfeile markiert. OTUs dieser Untersuchung sind durch dünne Klammern zusammengefasst, dicke Klammern markieren OTUs und alle Referenzstämmen, die eine höhere Anzahl identischer 16S rRNA Genpositionen zum Typstamm der OTU aufweisen, als das am entferntesten verwandte Isolat dieser OTU. Erläuterungen siehe Abbildung 24 und im Text.

### 3.1.5.1.3 Taxon *Cytophaga* / *Flavobacterium* / *Bacteroides*

Die 16S rRNA Gensequenzen der isolierten Flavobakterien zeigten nur geringe Verwandtschaft zu Sequenzen beschriebener Stämme, die in der Datenbank vorhanden waren. Insgesamt verteilen sich die isolierten Stämme auf 6 Taxa. Lediglich zwei Taxa waren nahe verwandt zu beschriebenen Arten, OTU Z zu *Cytophaga marinoﬂava* und V4.BE.50 zu *Flavobacterium salegenes*. Aufgrund von Sequenzunterschieden von > 5 % zu charakterisierten Typstämmen ließ sich folgern, daß die anderen Taxa, die OTUs M und V sowie die Isolate V4.MS.32 und V4.BS.09 möglicherweise eigene Genera bildeten. Eine 16S rRNA Gensequenz eines unidentifizierten Bakteriums, die zusammen mit OTU V gruppierte, wurde von (Giuliano *et al.*, 1999) an derselben Probennahmestelle gefunden, allerdings zu anderer Jahreszeit (15. – 21. Mai 1996) und unter Verwendung unterschiedlicher Methodiken (Analyse von geklonten 16S – PCR Produkten aus DNA – Extrakten von most probable number (MPN) – Verdünnungskulturen). Eine Darstellung in Dendrogrammform findet sich in Abbildung 26 (Seite 108).

### 3.1.5.1.4 Taxon *Actinobacteria*

Hinsichtlich der Diversität bezogen auf die Anzahl der Isolate waren die *Firmicutes* führend: Bei den *Actinobacteria* verteilten sich 38 Isolate auf 22 Taxa (davon 10 OTUs, 12 „Einzelisolate“), die 7 Isolate der *Firmicutes* mit niedrigem G+C- Gehalt ließen sich immerhin 4 Taxa zuordnen (davon zwei OTUs mit drei bzw. zwei Mitgliedern). Lediglich die „*Nocardioidea* – Assemblage“, die OTUs N, N' und N\* wiesen höhere Stückzahlen von zueinander ähnlichen Isolaten auf, alle übrigen OTUs wurden durch nicht mehr als zwei Stämme repräsentiert.

Die zu den *Actinobacteria* zählenden Isolate fanden sich in vier Gruppen, die sich anhand ihrer 16S rRNA Sequenzen deutlich voneinander trennen ließen: erstens, die *Micrococcus* / *Arthrobacter* Verwandtschaftsgruppe mit den OTUs J und 1 sowie den Isolaten V4.BP.16 und V4.MO.30, zweitens die *Clavibacter* / *Actinomyces* Gruppe mit der OTU 2 sowie den Isolaten V4.BE.21, V4.BE.51, V4.BE.53, V4.BO.29, V4.BO.43, V4.BO.47, V4.BP.11 und V4.MO.42, drittens die *Nocardioidea* – Gruppe mit den OTUs N, N' und N\* und den Isolaten und viertens die *Rhodococcus* - Gruppe mit den OTUs D und D' sowie dem Isolat V4.ME.23. Lediglich OTU Q ließ sich keiner dieser Gruppen zuordnen und zeigte weitläufige

Verwandschaft mit *Dermatophilus congolensis*. In Abbildung 27 (Seite 109) sind die Verwandtschaftsverhältnisse in Dendrogrammform dargestellt.

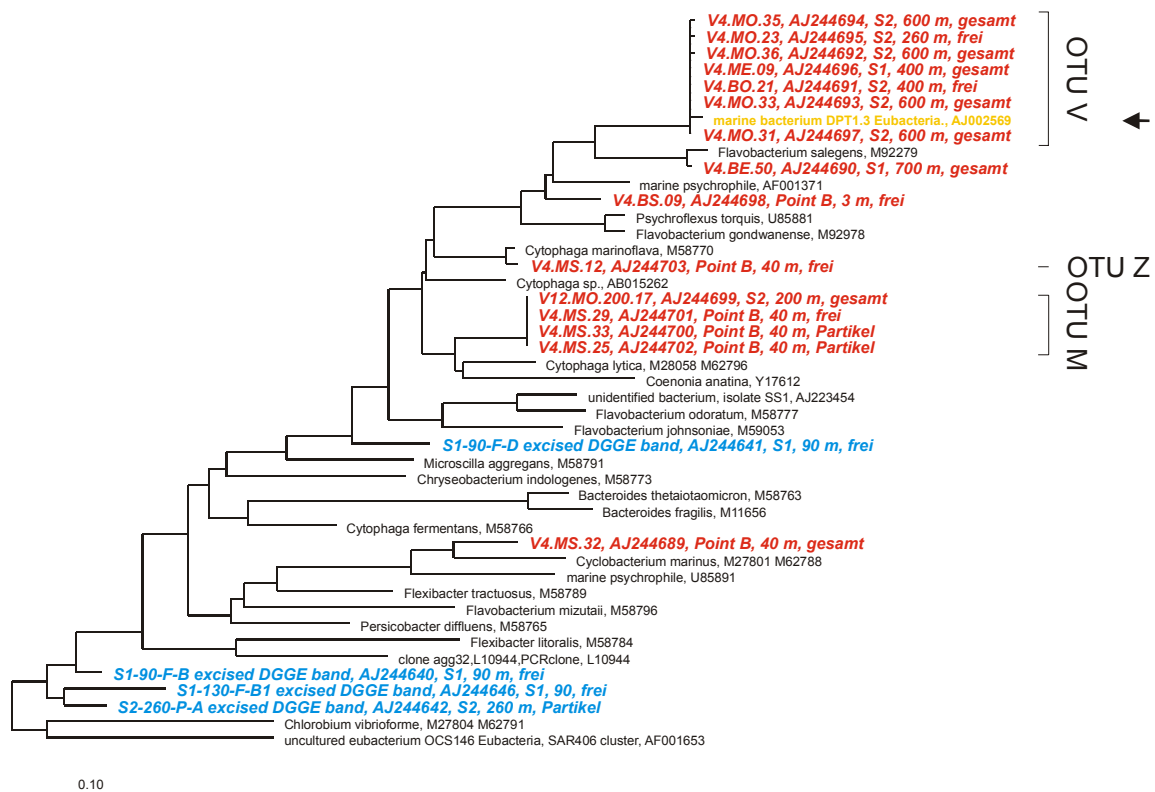


Abbildung 26 Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse von isolierten Flavobakterien zu ausgewählten Referenzstämmen aufgrund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA Gene. Die Sequenz eines molekularen Klon, die im Verlauf von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Probenmaterial vom Standort Villefrance s. M. erhalten wurde (Giuliano *et al.*, 1999), ist durch gelbe Beschriftung und einen Pfeil markiert. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 24 und Text.



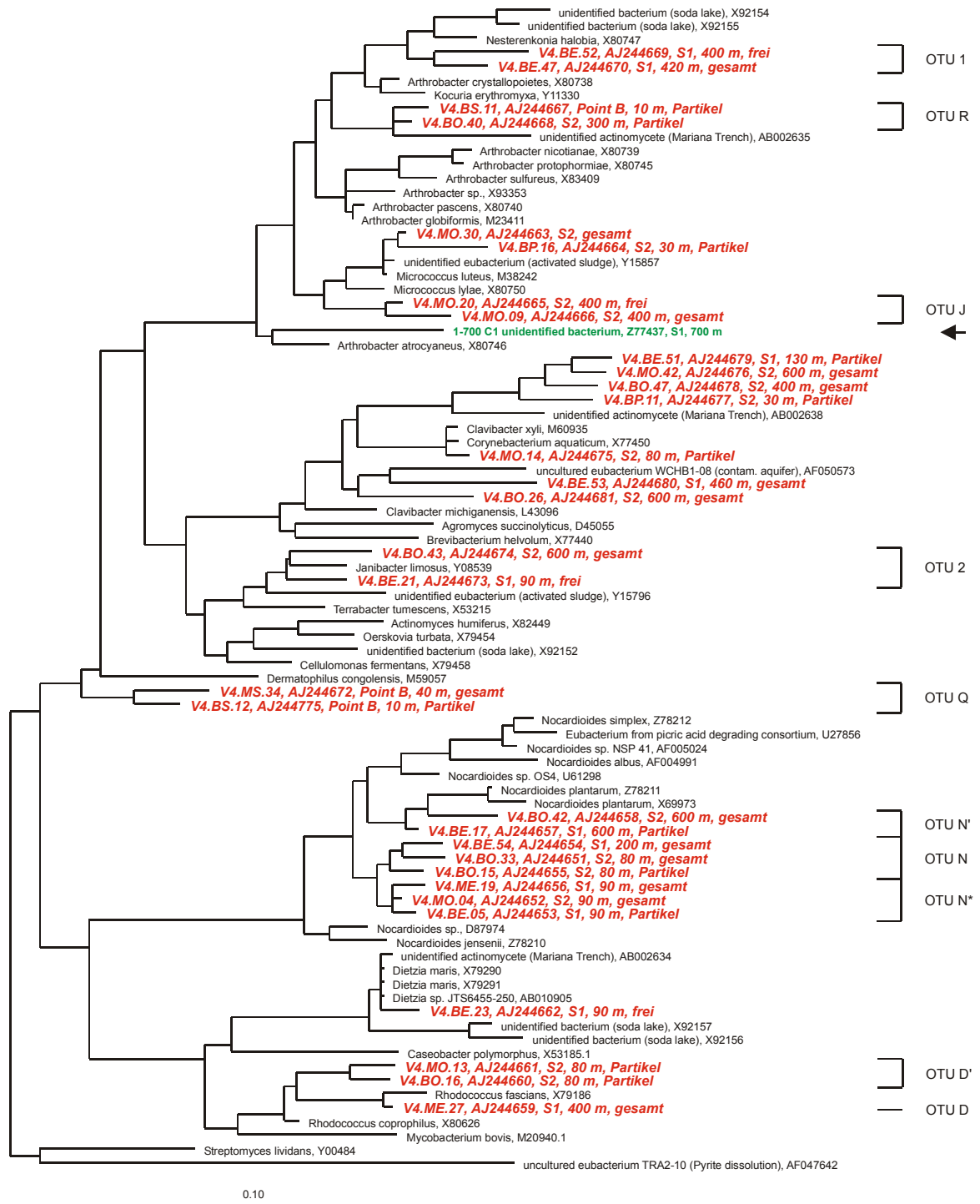


Abbildung 27: Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse von isolierten *Actinobacteria* zu ausgewählten Referenzstämmen aufgrund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA Gene. Ein dicker schwarzer Pfeil markiert die Affiliation einer Sequenz aus der Klonbank von Dr. Richard Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 24 und im Text.

### 3.1.5.1.5 Taxon *Firmicutes* (Gram Positive Bakterien) mit niedrigem G+C - Gehalt

Sieben Isolate wurden den *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt zugeordnet. Vier Isolate bildeten die dem Genus *Bacillus* zuzuordnende OTU T. Das Isolat V4.BE.30 stand dieser OTU hinsichtlich seiner 16S rRNA Gensequenz zwar nahe, unterschied sich aber sowohl hinsichtlich seiner LMW-RNA – Profilmuster als auch von seiner Koloniemorphologie deutlich gegenüber den Vertretern von OTU T (V4.BE.30 bildet die für einige *Bacillus cereus* var. *mycoides* - Stämme typischen pilzförmig auswachsenden Kolonien aus). OTU 3 ließ sich dem Genus *Staphylococcus* zuordnen. Die taxonomischen Verhältnisse sind im Dendrogramm in Abbildung 28 dargestellt.

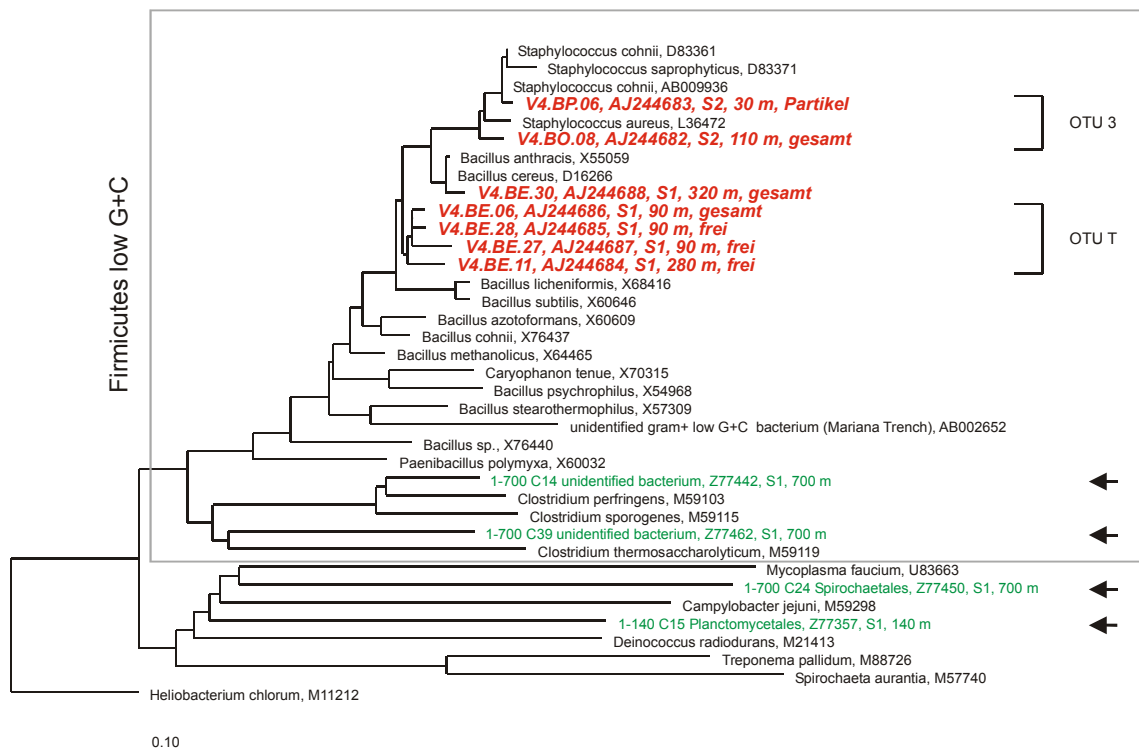


Abbildung 28: Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse von isolierten gram positiven Bakterien mit niedrigem G+C – Gehalt zu ausgewählten Referenzstämmen aufgrund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA Gene. Sequenzen innerhalb des Taxons *Firmicutes* mit niedrigem G + C Gehalt sind durch einen Rahmen gekennzeichnet, Sequenzen außerhalb des Rahmens zählen nicht zu diesem Taxon. Dicke schwarze Pfeile markieren die Affiliation von Sequenzen aus der Klonbank von Dr. Richard Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 24 und im Text.

### 3.1.5.1.6 Eukaryotische Isolate

10 von Station S2 erhaltene Isolate waren den Fungi innerhalb der eukaryotischen Domäne zuzuordnen. Neun dieser Isolate waren aufgrund identischer LMW-RNA Profile einer OTU, der OTU O, zuzuordnen. Diese OTU war dem Genus *Rhodotorula* zuzuordnen, dessen Vertreter oft aus Meerwasserproben isoliert werden können. Das verbleibende Isolat aus dem oberflächennahen Wasser war überraschenderweise dem Genus *Ustilago* zuzuordnen. Zu diesem Genus gehören die Erreger von Getreidebrand, *Ustilago hordei* und *Ustilago maydis*, marine Vertreter dieses Genus waren bislang nicht bekannt. Zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse siehe Abbildung 29.

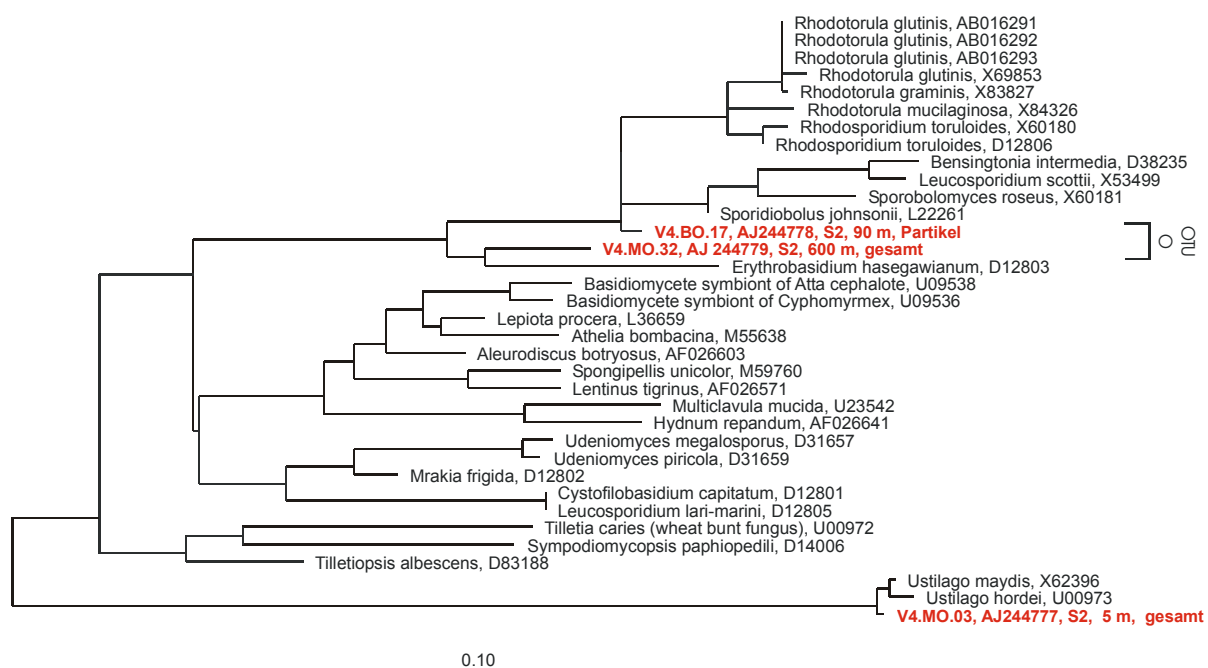


Abbildung 29: Dendrogramm der Verwandtschaftsverhältnisse von eukaryotischen Isolaten zu ausgewählten Referenzstämmen aufgrund von Sequenzvergleichen der 16S rRNA Gene. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 24 und im Text.

### 3.1.6 Taxonomische und *in situ* - Verteilung der OTUs

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Untersuchungen 227 Isolate charakterisiert und in insgesamt 56 taxonomisch unterschiedliche Gruppen eingeordnet. Die Verteilung der Isolate auf die einzelnen Stationen, Fraktionen der Wasserproben und der verwendeten Medien lassen sich Tabelle 1 entnehmen.

Station	Fraktion	MB - Medium	NMS + MeOH – Medium	Summe Isolate je Fraktion
<b>Station S1</b>	Filtrat [ $1\ \mu\text{m} > x > 0,2\ \mu\text{m}$ ]	24	5	29
	Gesamt (unfraktioniert)	21	20	41
	Retentat [ $> 1\ \mu\text{m}$ ]	10	5	15
<b>Summe Isolate S1</b>		55	30	85
<b>Punkt B</b>	Filtrat [ $1\ \mu\text{m} > x > 0,2\ \mu\text{m}$ ]	2	3	5
	Gesamt (unfraktioniert)	1	6	7
	Retentat [ $> 1\ \mu\text{m}$ ]	7	21	28
<b>Summe Isolate Punkt B</b>		10	31	41
<b>Station S2</b>	Filtrat [ $1\ \mu\text{m} > x > 0,2\ \mu\text{m}$ ]	5	8	13
	Gesamt (unfraktioniert)	25	23	48
	Retentat [ $> 1\ \mu\text{m}$ ]	28	12	40
<b>Summe Isolate S2</b>		58	43	101
<b>Summe Isolate je Medium</b>		123	104	227

Tabelle 12: Verteilung der Isolate auf die Stationen, Fraktionen der Wasserproben und die verwendeten Medien zur Isolation.

### 3.1.6.1 Verteilung der OTUs auf taxonomische Gruppen

Die Isolate ließen sich einer der folgenden taxonomischen Großgruppen zuordnen: Gamma – und Alpha – Subklasse der Proteobakterien, *Actinobacteria*, *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt, dem *Flavobacterium* – *Bacteroides* – Phylum sowie den *Fungi* (*Eucarya*) (siehe Abbildung 30). Die höchste Anzahl an Isolaten entstammten der Unterklasse der Gamma – Proteobakterien, sie umfassten fast 60 % aller Isolate und verteilen sich auf 15 OTUs. Die zahlenmäßig zweitgrößte Gruppe bildeten die *Actinobacteria*, 17 % aller Isolate gehörten zu dieser Gruppe und verteilten sich auf 14 OTUs. Es folgten: Alpha – Proteobakterien mit 10 % und 8 OTUs, *Flavobacterium* / *Bacteroides* mit 7 % und 6 OTUs, *Fungi* mit 4 % und 2 OTUs sowie *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt mit 3 % und 3 OTUs. Die Verteilung der Phyla auf die einzelnen Stationen läßt sich Tabelle 12 entnehmen.

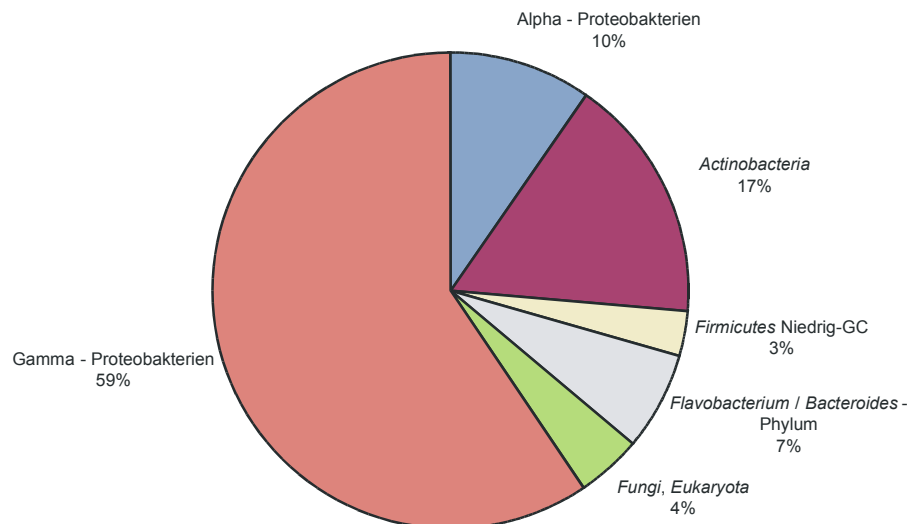


Abbildung 30: Relativer Anteil taxonomischer Großgruppen an der Gesamtanzahl aller Isolate.

### 3.1.6.2 Verteilung der OTUs auf die Stationen

Hinsichtlich der Verteilung der OTUs auf die beiden Stationen ergab sich ein unterschiedliches Bild: An Station S1 wurden 85 Stämme isoliert, die sich auf 25 OTUs verteilen, das entsprach einem Stamm / OTU – Verhältnis von 3,4. Von Station S2 wurden 101 Isolate 39 OTUs zugeordnet (Verhältnis Stamm / OTU 2,6), und von Punkt B 41 Isolate, die sich auf 15 OTUs verteilten (Verhältnis Stamm / OTU 2,7). Die Ergebnisse von Punkt B sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt und in diesem Vergleich mit Vorbehalt zu betrachten, da die Probennahme an dieser Stelle auf andere Weise erfolgte (durch Taucher handgesammelte Partikel), nur Wasserproben bis 40 m Tiefe untersucht wurden und bei der Isolierung von Bakterien an dieser Stelle gezielt partikelgebundene Mikroorganismen isoliert werden sollten.

Im Vergleich zwischen Station S1 und S2 zeigten sich bedeutende Unterschiede in der Abundanz der einzelnen isolierten Taxa. Bei den Isolat von Station S1 dominierte die OTU B (*Pseudoalteromonas sp.*). Mit 46 % aller Isolate stellte sie fast die Hälfte aller an S1 isolierter Organismen dar. Relativ stark war an Station S1 auch OTU K (*Psychrobacter sp.*) mit einem Anteil von 13 % an der Gesamtzahl der Isolate vertreten. Keine der übrigen 23 Taxa erreichte an Station S1 einen Anteil von mehr als 5 %. Demgegenüber zeigte sich an Station S2 ein Bild wesentlich höherer Diversität. Zwar bildete OTU B auch an Station S2 zahlenmäßig die stärkste Fraktion, allerdings waren nur 12 % aller Isolate von S2 dieser OTU zuzurechnen. 5 OTUs von insgesamt 39 Taxa besaßen einen Anteil von mehr als 5 % an der Gesamtzahl der Isolate. Zu erwähnen ist allerdings, daß der Vergleich absoluter wie relativer Abundanzen aus methodischen Gründen nur eingeschränkte Aussagekraft besitzt. Dieser Punkt wird im Diskussionsteil eingehend behandelt, im weiteren Verlauf wird eine Auswertung im Hinblick auf Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein einzelner Taxa eine höhere Aussagekraft eingeräumt, als den Abundanzen.

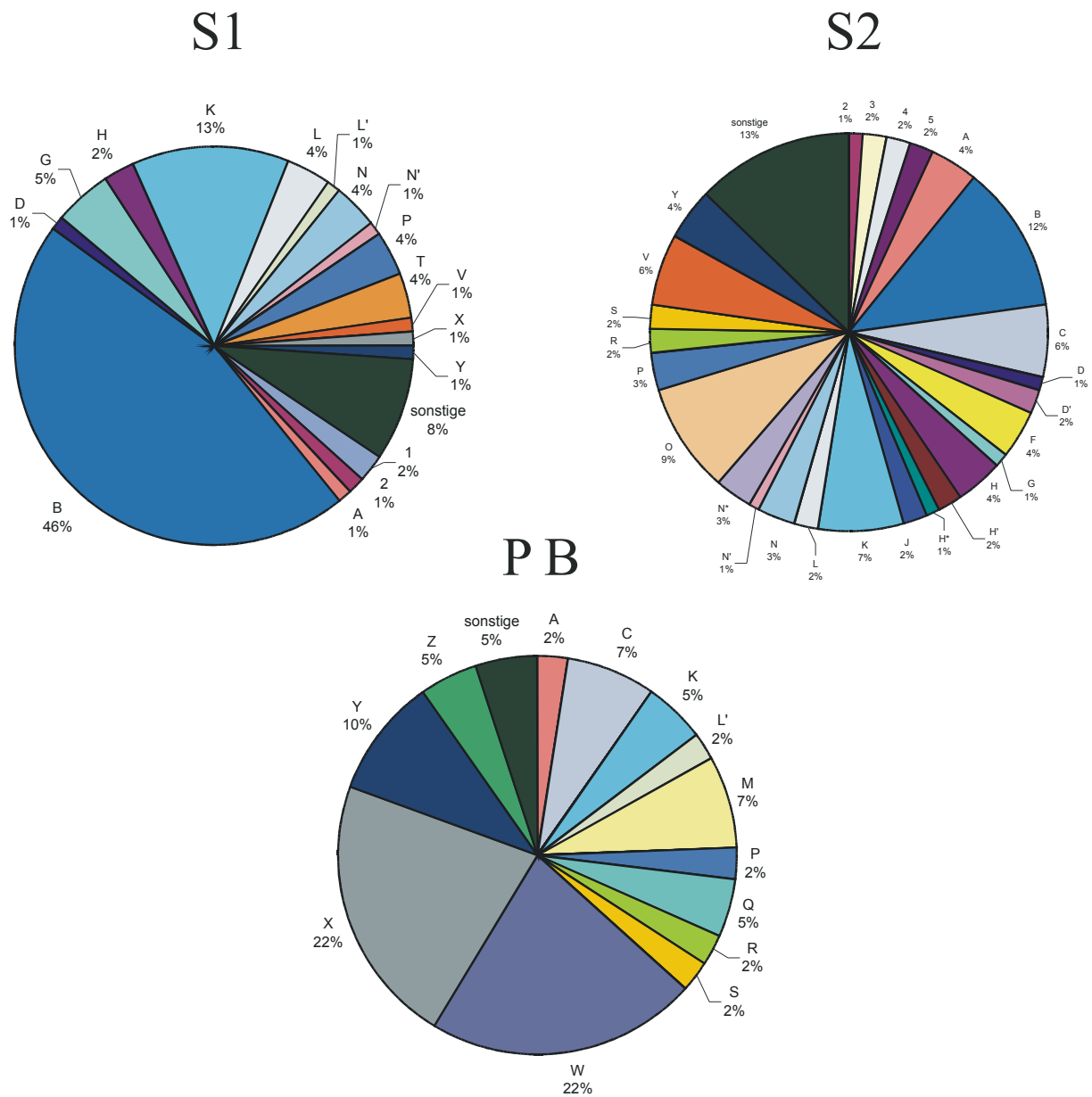


Abbildung 31: Vergleich der relativen Anteile der OTUs an der Gesamtzahl der Isolate. Abkürzungen: P B, Punkt B; S1, Station S1; S2 Station S2.

Der Eindruck höherer taxonomischer Diversität von S2 im Vergleich zu S1 bestätigt sich, wenn man die relativen Anteile der taxonomischen Großgruppen an S1 und an S2 ermittelt, wie in Tabelle 13 geschehen. An Station S1 dominierten klar die  $\gamma$  - Proteobakterien. Zu dieser taxonomischen Gruppe waren nahezu drei Viertel aller Isolate von S1 zu rechnen, während sie an S2 nicht einmal die Hälfte aller Isolate stellten. Zweitstärkste Fraktion waren an beiden Stationen die *Actinobacteria*. Mehr als ein Fünftel aller Isolate an S2 und immerhin ein Achtel aller Isolate von S1 waren dieser Gruppe zuzurechnen. Betrachtet man anstelle der relativen Abundanzen die Anzahl unterschiedlicher Taxa, so fällt auf, daß eine höhere Anzahl verschiedener *Actinobacteria* - Taxa als  $\gamma$  - proteobakterieller Taxa isoliert wurde, obwohl erstgenannte Gruppe durch eine niedrigere Anzahl an Isolaten vertreten war. An Station S2 waren im Vergleich zu S1 sowohl in Bezug auf die Isolate- als auch auf Taxaanzahl häufiger  $\alpha$  - Proteobakterien isoliert worden. Außerdem wurden von Station S2 zwei eukaryotische Taxa isoliert. Eukaryotische Isolate, die an dieser Station 10 % der Gesamtanzahl an Isolaten ausmachen, wurden von keiner der beiden anderen untersuchten Stationen erhalten.

Die Isolate von Punkt B unterschieden sich hinsichtlich ihrer taxonomischen Affiliation deutlich von Station S1 und S2, was sich möglicherweise auch durch den unterschiedlichen Probenahmemodus erklärt. Bemerkenswerterweise wurde die an S1 und S2 abundante OTU B an Punkt B nicht isoliert. Stattdessen stellten drei OTUs, OTU W, (*Deleya sp.*), OTU X (*Marinobacter sp.*) und OTU Y (*Methylophaga sp.*) mehr als 50 % der Isolate. Eine der beiden abundantesten OTUs der Isolate von Punkt B, OTU W, war weder an S1 noch an S2 gefunden worden, von der anderen abundanten OTU X wurde lediglich an S1 ein Isolat erhalten.

Vergleicht man die Stationen S1, S2 und Punkt B nicht nach den relativen Abundanzen, sondern nach dem Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Taxa, so findet man für jede Station exclusive OTUs, die nur von dieser Station, nicht aber von den beiden anderen Stationen isoliert werden konnten. Das waren für Station S1 die OTUs 1 und T (außerdem wurden alle dem Genus *Bacillus* zuzurechnenden Isolate ausschließlich von S1 isoliert); für den Punkt B die OTUs L', W, X und Z und für Station S2 die OTUs 3, 4, 5, C, D', F, H', H\*, J, N\* und O. Zu den Isolaten, die an einer der drei Stationen nicht isoliert wurden, bei den beiden anderen Stationen allerdings vorhanden waren, zählten an S1 die OTUs C und R, an Station S2 die OTUs L' und X sowie an Punkt B die OTUs 2, B, D, G, H, L, N, N' und V. Lediglich vier OTUs wurden an allen drei Stationen nachgewiesen: die zu den  $\alpha$ -Proteobakterien zählende OTU A sowie die  $\gamma$  - proteobakteriellen OTUs K, P und Y. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 14, eine grafische Darstellung in Abbildung 32.

	<b>Punkt B</b> <b>Anteil [%]/</b> <b>Anzahl Taxa</b>	<b>Station S1</b> <b>Anteil [%] /</b> <b>Anzahl Taxa</b>	<b>Station S2</b> <b>Anteil [%]/</b> <b>Anzahl Taxa</b>
<b>Alpha – Proteobakterien</b>	2,4 / 1	4,7 / 3	16,8 / 7
<b>Gamma – Proteobakterien</b>	73,2 / 9	74,1 / 8	43,6 / 11
<b><i>Actinobacteria</i></b>	7,3 / 2	12,9 / 8	21,8 / 17
<b><i>Firmicutes</i> Niedrig – G+C</b>	0	5,9 / 3	2,0 / 1
<b>Flavobacterium / Bacteroides</b>	17,1 / 3	2,4 / 1	5,9 / 1
<b>Fungi / Eukaryota</b>	0	0	9,9 / 2

Tabelle 13: Prozentualer Anteil der Phyla an der Gesamtzahl der Isolate von den Stationen S1, S2 und dem Punkt B sowie Anzahl der Taxa, die den entsprechenden Phyla zuzuordnen sind. Als einzelnes Taxon wird hier entweder eine OTU oder ein Isolat, welches keiner OTU zuzuordnen ist („Einzelläufer“) bezeichnet.

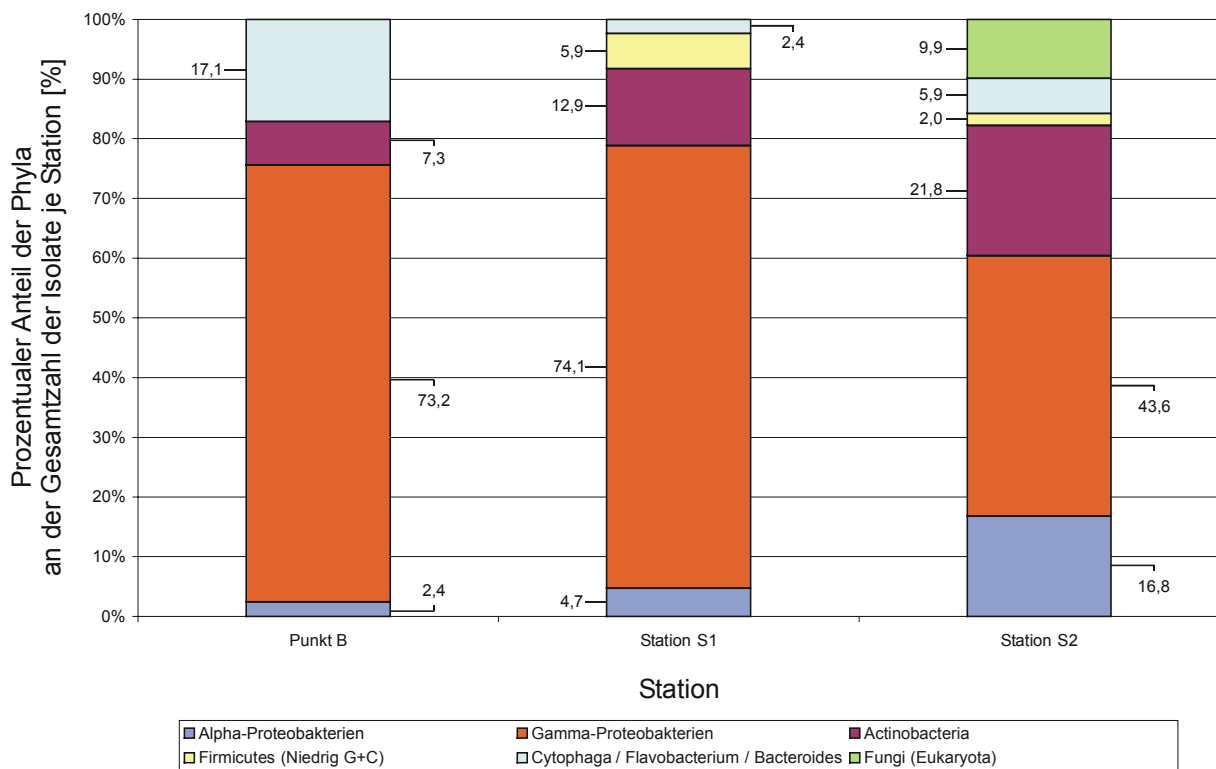


Abbildung 32: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile der Phyla an der Gesamtzahl der Isolate von den Stationen S1, S2 und dem Punkt B. Zahlenwerte repräsentieren die prozentualen Anteile einzelner Taxa bezogen auf die Gesamtzahl an Isolaten je Station. Weitere Erläuterungen siehe Tabelle 13.



Taxonomie		Anz. Isolate	Präferenzen			Isoliert von		
OTU	nächster 16S rRNA Verwandter		Präf. Fraktion	Präf. Tiefe [m]	Präf. Medium	MBP	S1	S2
1	Arthrobacter crystallopoites like sp.	2	Filtrat	400 - 420	MB			
2	Janibacter sp.	2	Filtrat		MB			
3	Staphylococcus sp.	2	Retentat		MB			
4	Stentrophomonas maltophilia like sp.	2	Retentat	30	MB			
5	Alcanovorax sp.	2	Retentat					
A	Sphingomonas / Erythrobacter like sp.	6	(Retentat)	5 - 140	(MB)			
B	Pseudoalteromonas sp.	51	(Filtrat)					
C	Vibrio sp.	9	(Retentat)	3 - 150	(MB)			
D	Rhodococcus fascians like sp.	2						
D'	Rhodococcus sp.	2	Retentat					
F	Manganese oxidizing alpha-proteo	4	(Retentat)	110	NMS+MeOH			
G	Alteromonas macleodii	5			(MB)			
H	Brevundimonas intermedia	6			MB			
H'	Brevundimonas vesicularis	2			MB			
H*	Brevundimonas subvibrioides	1			MB			
J	Micrococcus lylae like sp.	2	Filtrat		NMS+MeOH			
K	Psychrobacter glacinicola like sp.	20						
L	Acinetobacter johnsonae like sp.	5	Retentat		(NMS+MeOH)			
L'	Acinetobacter sp.	2	Retentat					
M	Flavobacterium mediterranean group M	3			NMS+MeOH			
N	Nocardioides mediterranean group N	6		80 - 200	(MB)			
N'	Nocardioides like sp.	2		600	MB			
N*	Nocardioides mediterranean group N*	3	Retentat	80	MB			
O	Rhodotorula sp.	9	Retentat		(NMS+MeOH)			
P	Pseudomonas stutzeri like sp.	7	Retentat	siehe Text	(MB)			
Q	Dermatophilus like sp.	2	Retentat					
R	Arthrobacter mediterranean group R	3	Retentat		MB			
S	Pseudomonas synxantha like sp.	3	Retentat	5 - 40				
T	Bacillus sp.	3	Filtrat	90 - 280	MB			
V	Flavobacterium mediterranean group V	7	Filtrat	260 - 600	(NMS+MeOH)			
W	Deleya aquamarina like sp.	9	(Retentat)		NMS+MeOH			
X	Marinobacter sp.	10	(Retentat)		(NMS+MeOH)			
Y	Methylophaga sp.	9	Retentat		(NMS+MeOH)			
Z	Cytophaga marinoflava like sp.	2			NMS+MeOH			

## Legende:

	Alpha - Proteobakterien
	Gamma - Proteobakterien
	Firmicutes Hoch - GC
	Firmicutes Niedrig - GC
	Flavobacterium / Bacteroides
	Fungi / Eukaryota

Tabelle 14: Präferenzen der OTUs für Fraktion, Tiefe, Isolationsmedium und Station. Präferenzen: Keine Angabe bedeutet: keine Präferenzen aufgrund des Datenmaterials feststellbar. Farbige ausgefüllte Kästchen symbolisieren Vorhandensein bzw. weißes Kästchen Abwesenheit der OTUs an den Stationen S1, S2 und an dem Punkt B. Die Farbe des Kästchens symbolisiert die taxonomische Position der jeweiligen OTU, wie in der Legende dargestellt. Abkürzungen: Anz, Anzahl; S1 bzw. S2, Station 1 bzw. Station 2; P B, Punkt B.

### 3.1.6.3 Tiefenabhängige Verteilung der OTUs

Wie in Abbildung 33 dargestellt, schienen einige OTUs bevorzugt in bestimmten Tiefenstufen vorzukommen. Lediglich die zahlenmäßig am stärksten repräsentierte OTU B (*Pseudoalteromonas sp.*) wurde in allen Tiefenstufen gefunden. OTU K (*Psychrobacter sp.*), die zweitstärkste OTU, wurde fast ausschließlich aus dem oberflächennahen Wasser bis zu einer Tiefe von 110 m isoliert, lediglich ein einziges Isolat dieser OTU wurde aus einer Tiefe von 420 m erhalten (Dieses Isolat unterschied sich in einem weiteren interessanten Merkmal von den übrigen Isolaten der OTU K: Es handelte sich bei diesem Isolat um eine von ca.  $10^3$  Kolonien identischen Aussehens, die einmalig auf einer Agarplatte gefunden wurden, auf der offensichtlich ein sehr großes, homogenes Zellaggregat ausgestrichen worden war. Zum Vergleich: Bei den beiden parallelen Platten der Triplikate wurden lediglich ca.  $10^2$  CFUs pro Platte erhalten.). Präferenzen für das oberflächennahe Wasser besaßen ebenfalls die OTUs A (5 m bis 140 m), C (3 m bis 150 m), X (40 m bis 90 m) sowie die *Pseudomonas sp.* – OTU S (5 m bis 40 m). Bemerkenswerterweise wurde die zweite *Pseudomonas sp.* – OTU P lediglich an Station S2 und dem Punkt B aus dem oberflächennahen Wasser (30 m – 110 m) isoliert, an S1 fand sich diese OTU nur in Tiefen von 400 m bis 460 m. Noch ausgeprägter war die räumliche Zonierung der *Nocardioides* – Isolate: Wurde OTU N aus 80 - 200 m Tiefe isoliert, so konnte OTU N\* lediglich in 80 m und OTU N' lediglich in 600 m Tiefe gefunden werden. Deutlich unterhalb des oberflächennahen Wassers waren die Isolate von OTU T (90 – 280 m) zu finden. OTU H (nicht aber die nahe verwandten OTUs H' und H\*), zum Genus *Brevundimonas* zugehörig, trat in bestimmten Wasserschichten in hoher Abundanz auf. In diesen Wasserschichten trugen die charakteristischen Kolonien zu mehr als 50 % aller CFUs auf den Agarplatten bei (Daten nicht gezeigt). Erst ab einer Tiefe von 260 m wurden Isolate der OTU V (*Flavobacterium sp.*) nachgewiesen.

Die Vielfalt der Koloniemorphologien schien sich mit zunehmender Tiefe zu reduzieren. Konsistent mit dieser Beobachtung ist der optische Eindruck beim Betrachten der Vielfalt verschiedener Koloniemorphologien auf den mit Meerwasser inokulierten, ausgangs zur Isolierung benutzten Agarplatten: Demzufolge war eine hohe Diversität im oberflächennahen Wasser festzustellen. Die Diversität reduzierte sich mit zunehmender Tiefe zu einer beschränkten Zahl von Koloniemorphologien, die zum großen Teil denjenigen der OTUs B und V ähnelte (Daten nicht gezeigt). Ein stark zoniertes Vorkommen zeigte sich bei den OTUs 1 und F: OTU 1 konnte nur an S1 in ca. 400 m Tiefe, OTU F ausschließlich an S2 in 110 m Tiefe isoliert werden.

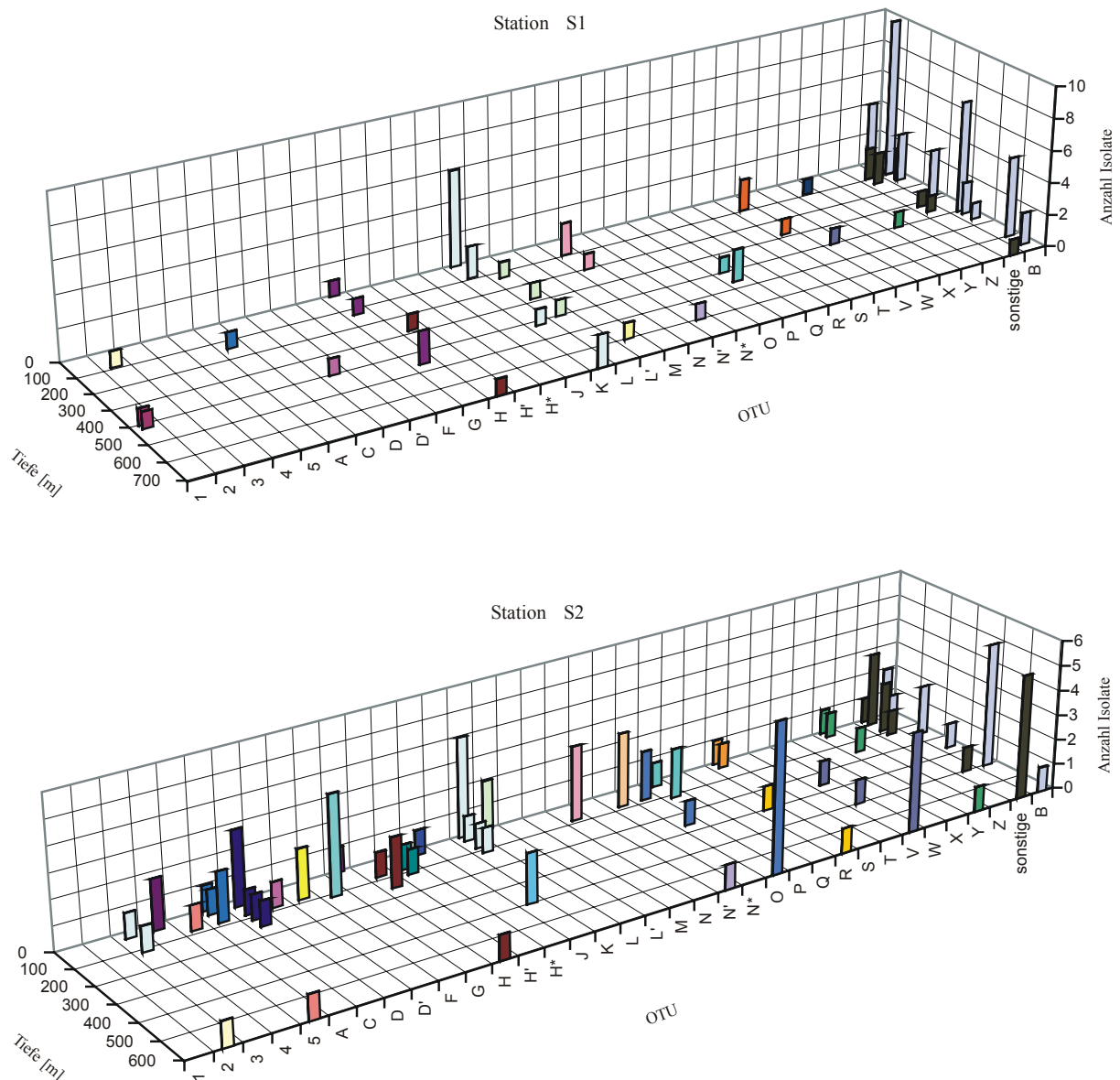
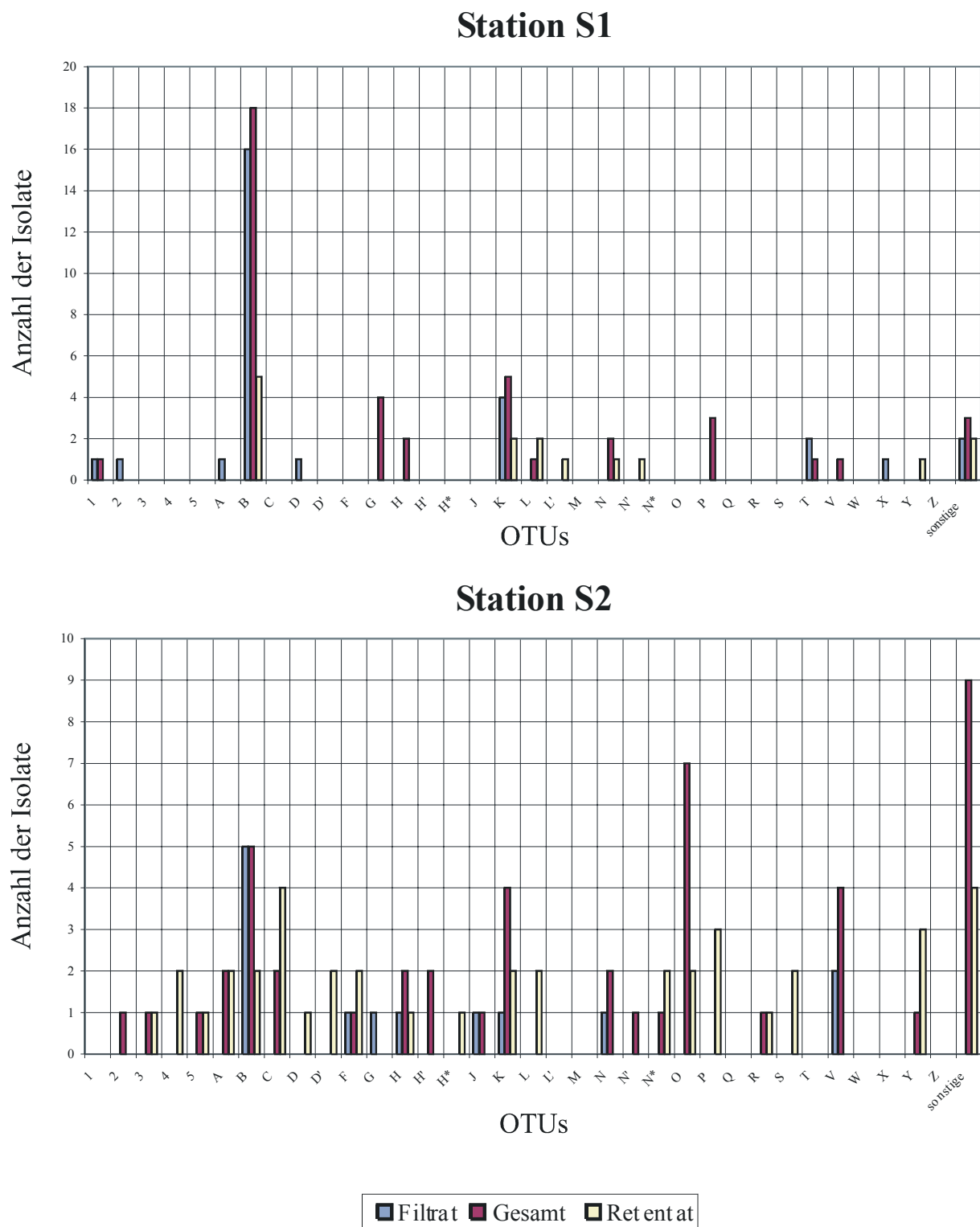


Abbildung 33: Tiefenverteilung der OTUs an den Stationen S1 und S2.

### 3.1.6.4 Verteilung der OTUs auf die Fraktionen

Die fraktionierte Isolierung, bei der Bakterien entweder aus resuspendiertem Filterretentat (Porengröße des Filters: 1  $\mu\text{m}$ ) oder aus Filtrat isoliert wurden, sollte Aussagen darüber ermöglichen, ob der Lebensraum der isolierten Mikroorganismen der freie Wasserkörper ist oder ob sie sich *in situ* partikelgebunden aufhalten.



Taxa, die ausschließlich aus resuspendiertem Filterretentat bzw. unfraktionierten Wasserproben isoliert wurden, und von denen aus diesem Grund angenommen werden kann, daß sie sich *in situ* bevorzugt partikelgebunden aufhalten, sind die OTUs 3, 4, 5, C, D', L, L', N', N', O, P, R, S und Y. Ausschließlich aus dem Filtrat bzw. aus unfraktionierten Wasserproben wurden die OTUs 1, 2, G, J und V isoliert. Allerdings ist fraglich, ob sich angesichts von Grundgesamtheiten von zwei Isolaten bei einigen OTUs gültige Aussagen über den Lebensraum der Mikroorganismen ableiten lassen. Sinnvoller erscheint es, Aussagen hierüber auf OTUs zu begrenzen, die durch eine größere Anzahl an Isolaten repräsentiert sind. Kriterium zur eindeutigen Zuordnung sollte sein, daß eine OTU häufiger entweder aus der Filtrat- oder Retentat – Fraktion isoliert wurde, als aus der jeweils anderen Fraktion. Eine Isolation aus unfraktionierten Wasserproben (Gesamt – Fraktion) ermöglicht keine Aussage darüber, ob ein Organismus bevorzugt freilebend oder partikelgebunden auftritt. Isolate aus der Gesamt – Fraktion werden hier deshalb ausgeklammert. Wie aus Abbildung 34 und Abbildung 35 hervorgeht, kann man dann folgende Aussagen treffen: Bevorzugt aus dem Retentat isoliert wurden die OTUs C, X, Y, die beiden nahe miteinander verwandten OTUs L und L' (*Acinetobacter sp.*), die *Nocardioides* – Assemblage N, N' und N\*, die beiden *Pseudomonas sp.* – OTUs P und S, während andererseits die OTUs B, und V sowie die *Bacillus* – Assemblage (OTU T sowie zwei nahe verwandte „Einzelläufer“) häufiger im Filtrat zu finden waren. Keines der eukaryotischen Isolate wurde aus der Filtrat – Fraktion erhalten, da bei diesen Isolaten die Größe der Zellen jedoch die Porengröße des Filters übersteigt, wurde keine Aussage darüber getroffen, ob diese OTUs *in situ* freilebend oder partikelgebunden vorkommen. Die zahlenmäßige Verteilung der Isolate auf taxonomische Großgruppen, sortiert nach freilebender, partikelgebundener und gesamter Fraktion ist in Tabelle 15 aufgeführt und wird grafisch in Abbildung 35 dargestellt.

Fraktion	Filtrat	Gesamt	Retentat	Summe Phyla
<b>Alpha – Proteobakterien</b>	3	10	9	22
<i>Actinobacteria</i>	6	19	13	38
<i>Firmicutes</i> Niedrig-G+C	3	3	1	7
<i>Flavobacterium</i> / <i>Bacteroides</i>	5	8	2	15
<b>Fungi, Eukaryota</b>	0	8	2	10
<b>Gamma – Proteobakterien</b>	30	49	56	135
<b>Summe Fraktion</b>	47	96	83	227

Tabelle 15: Zahlenmäßige Verteilung der Isolate auf taxonomische Großgruppen, sortiert nach der Fraktion (Filtrat, Retentat, Gesamt).

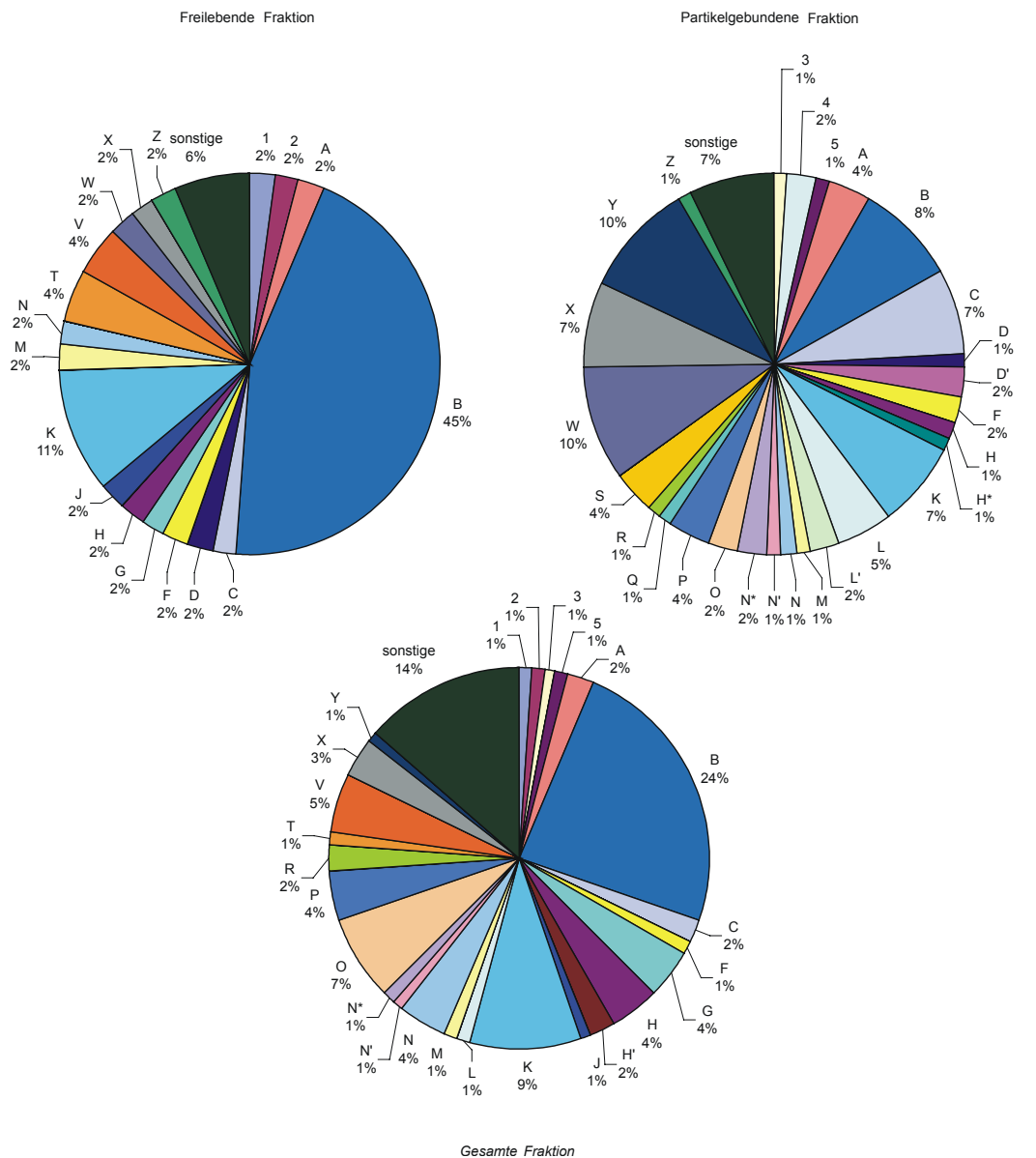


Abbildung 35: Verteilung der OTUs auf die freilebenden, partikelgebundenen und gesamten Fraktionen.

### 3.1.6.5 Verteilung der OTUs auf unterschiedliche Isolationsmedien

Insgesamt wurden 123 Isolate, die sich auf 45 unterschiedliche Taxa verteilen, auf MB – Medium und 104 Isolate mit 29 unterschiedlichen Taxa auf NMS + Methanol – Medium isoliert. Wie zu erwarten war, zeigte es sich, daß eine deutliche Abhängigkeit zwischen dem verwendeten Isolationsmedium und den von diesen Medien isolierten OTUs bestand. Fast alle OTUs zeigten entweder deutliche Präferenzen entweder für MB – Medium (A, C, G, P) oder für NMS+Methanol Medium (L, V, X, Y). Einige OTUs ließen sich sogar ausschließlich entweder von MB - (OTUs 1, 2, 3, 4, H, H', H\*, N', N\*, R, T)) oder von NMS + Methanol –

Medium (F, J, M, W, Z) isolieren. Einige OTUs zeigten keine deutlichen Präferenzen und ließen sich von beiden Medien mit vergleichbarer Häufigkeit isolieren.. Hierzu gehörten die beiden zahlenmäßig abundantesten OTUs B und K sowie die OTUs 5, D und D', L' (nicht aber L), N (nicht aber N' und N\*), O, Q und S. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 14.

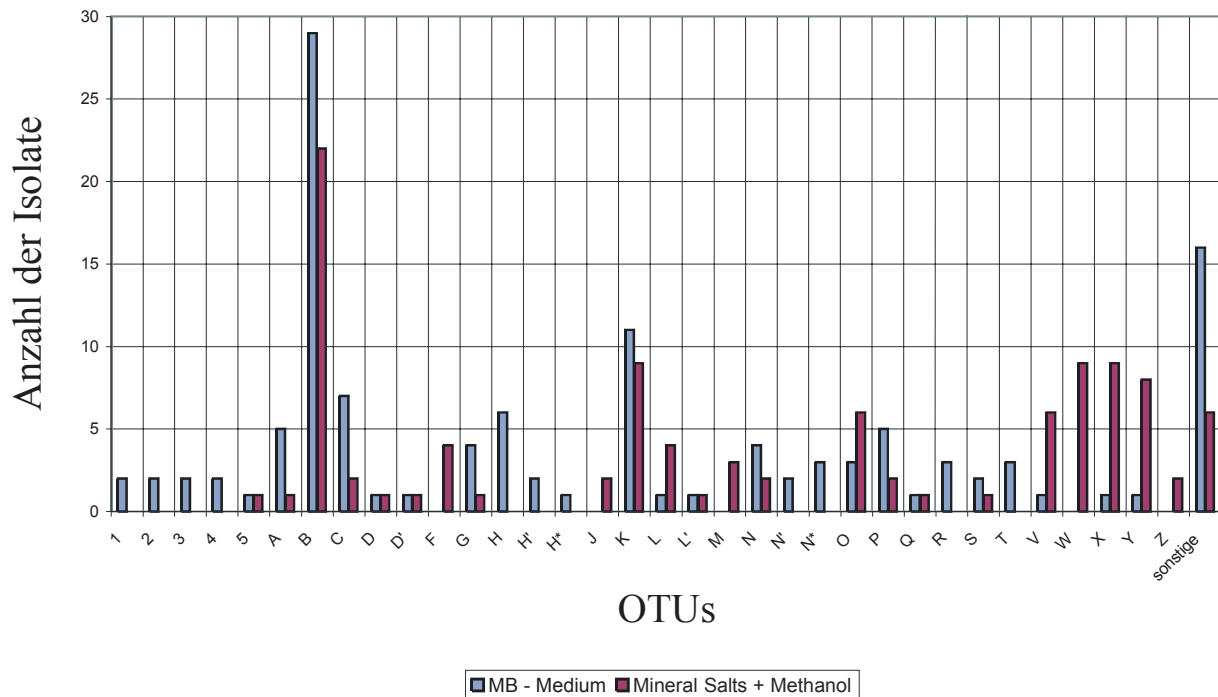


Abbildung 36: Abhängigkeit der Isolation einzelner OTUs vom verwendeten Medium.

### 3.1.7 Taxonomische Charakterisierung ausgewählter Isolate der Gattung *Brevundimonas*

Bei der Analyse der LMW – RNA – Profile findet ein Vergleich der Bandenmuster der niedermolekularen RNAs statt. Da die Identität der einzelnen Banden der LMW – RNA Profilmuster nicht bekannt ist, lassen sich einzelne tRNA - Banden verschiedener Organismen nicht miteinander homologisieren. Für nahe verwandte Organismen, die sich nur in einer oder wenigen Bandenpositionen unterscheiden, kann eine Homologie der verschobenen Banden angenommen werden, eine Homologisierung einzelner tRNAs phylogenetisch unterschiedlicher Organismen ist jedoch ohne Sequenzierung der aus dem Gel ausgeschnittenen tRNAs nicht möglich. Beim Vergleich nahe verwandter Organismen sind die Bandenmuster aber oft ähnlich und unterscheiden sich oft in nur ein bis zwei Banden. Bei der Analyse der Mittelmeerisolate wurden drei Organismengruppen gefunden, deren Vertreter zueinander jeweils sehr ähnliche Bandenmuster besaßen. Die Isolate unterschieden sich in der Position von einer bzw. zwei Banden und wurden in die drei OTUs H, H' und H\* eingeordnet. OTU H besaß Klasse II - tRNAs bei 94, 92, 88 und 86 nt, OTU H' bei 96, 92, 88 und 86nt sowie OTU H\* bei 94, 92, 87, 86 und 85 nt. Eine Sequenzierung der 16S rRNA -

Gene ergab, daß die drei Organismen dem Genus *Brevundimonas* zuzuordnen waren. Da im bisherigen Verlauf der Untersuchungen Stämme von Mikroorganismen durch LMW – RNA Analysen in OTUs eingeteilt wurden, ergab sich die Frage, inwiefern die gewählte Einteilung in OTUs auch tatsächlich Unterschiede in der Physiologie und damit möglicherweise auch der Ökologie der Mikroorganismen repräsentiert. Zunächst galt es zu klären, wie sich weitere Vertreter des Genus *Brevundimonas* von den Isolaten hinsichtlich ihrer LMW-RNA Profile unterschieden. Dazu wurden weitere Vertreter des Genus *Brevundimonas* sowie Vertreter des nahe verwandten Genus *Caulobacter* auf ihre LMW-RNA Profile untersucht. Weiterhin wurden die folgenden Stämme in die Untersuchung einbezogen: die drei *Brevundimonas* sp. LMG 9564, LMG 9567t1, LMG 11070 und, um die Außengrenze der Gattung *Brevundimonas* zu bestimmen, der lose mit der Gattung *Brevundimonas* assoziierte Stamm LMG 11050, als *Brevundimonas* like sp. beschrieben. Diese vier Stämme wurden in (Segers *et al.*, 1994b) phänotypisch charakterisiert, allerdings lagen für keinen der Stämme vor Beginn der Untersuchungen 16S rRNA Sequenzdaten oder LMW – RNA Profilanalysen vor.

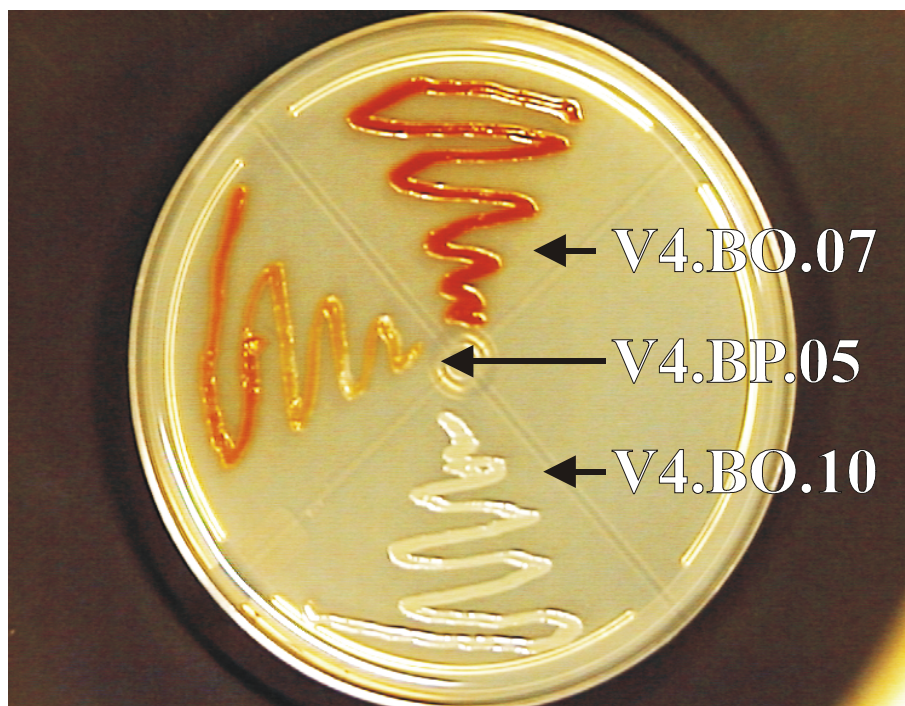


Abbildung 37 Phänotypische Unterschiede zwischen den verwandten Stämmen V4.BO.07 (OTU H<sup>+</sup>), V4.BO.10 (OTU H) und V4.BP.05 (OTU H<sup>\*</sup>) aufgrund ihrer Koloniemorphologie. Zum Vergleich der Verwandtschaft auf 16S rRNA – Gensequenz – Ebene siehe Abbildung 41, zur Ähnlichkeit der LMW-RNA – Profile siehe Abbildung 40.



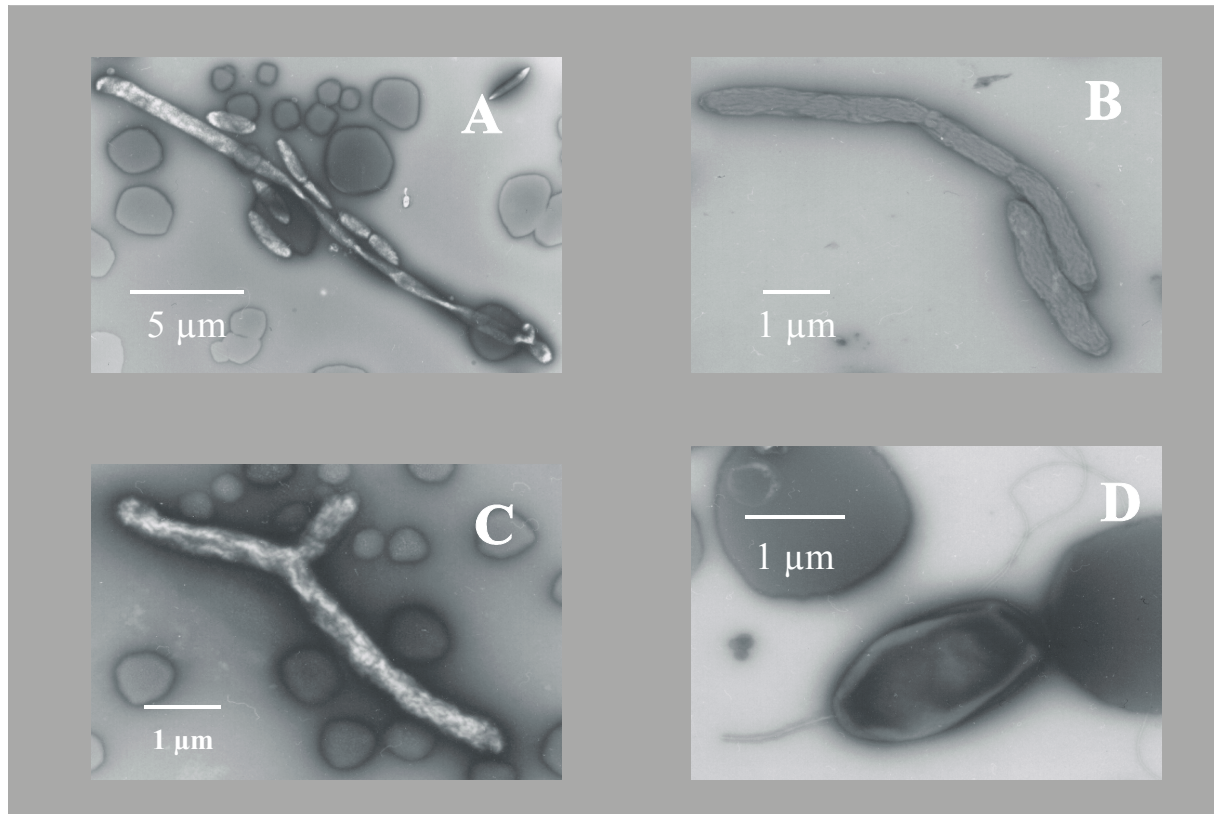


Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Negativkontrast) von Isolaten mit Affiliation zu den  $\alpha$ -Proteobakterien: A, V4.BO.07 (OTU H<sup>+</sup>); B, V4.BO.10 (OTU H); C, V4.BO.22 (beachte die Ausbildung von Ästen, deswegen in der Literatur fälschliche Zuordnung verwandter Stämme zum Genus *Mycoplana*); D, V4.MO.05 (OTU F, verwandt zu *Mycoplana dimorpha*). In den Abbildungen erscheinen während der Fixierungsprozedur auskristallisierte Bestandteile des Mediums als graue kugelförmige Elemente.

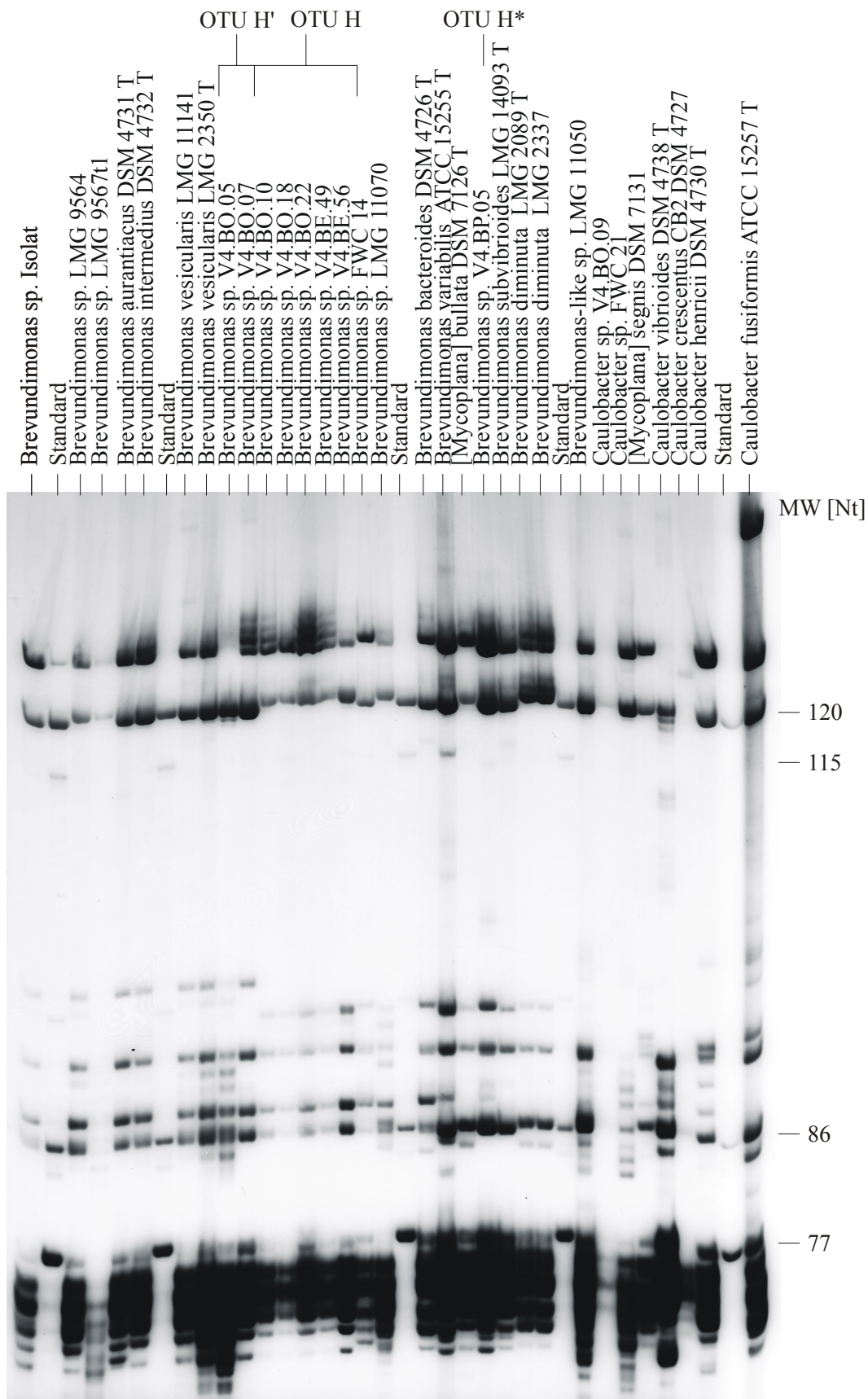


Abbildung 39: LMW – RNA Profile von Vertretern der Genera *Brevundimonas* und *Caulobacter*. Abkürzungen: T, Typstamm; MW, Molekulargewicht; Nt, Nucleotide

Die LMW – RNA – Profilbandenmuster wurden nach Ähnlichkeiten geordnet mit Hilfe des Ähnlichkeitskoeffizienten von Pearson (1926) und eine Clusterung mittels UPGMA durchgeführt. Lediglich die Banden oberhalb der Klasse I tRNA wurde in die Auswertung einbezogen. Wurden die Klasse I tRNAs mit in die Berechnung des – Bandenintensitäten berücksichtigenden - Koeffizienten einbezogen, trat eine Verfälschung der Ergebnisse auf, resultierend in einer nicht konsistentem Clusterung. Dieser Effekt liegt darin begründet, daß die Klasse I tRNAs in den Gelen erstens nicht gut aufgelöst worden sind, zweitens Banden im Bereich zwischen 77 und 72 nt praktisch bei allen untersuchten Organismen auftraten und drittens diese Banden zu mehr als 50 % der Gesamt - OD aller Banden einer Spur beitrugen. Die Folge war, daß zur korrekten Einordnung signifikante Banden bei Einbeziehung der Klasse I tRNA Banden lediglich mit ihrem Beitrag von 1 % bis 5 % der spurinternen Gesamt - OD in die Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten eingingen, während die uninformativen Klasse I tRNA Banden einen Anteil von mehr als der Hälfte der OD - Gesamtintensitäten auf sich vereinigen konnten. Das Ergebnis der Clusteranalyse findet sich in Abbildung 40.

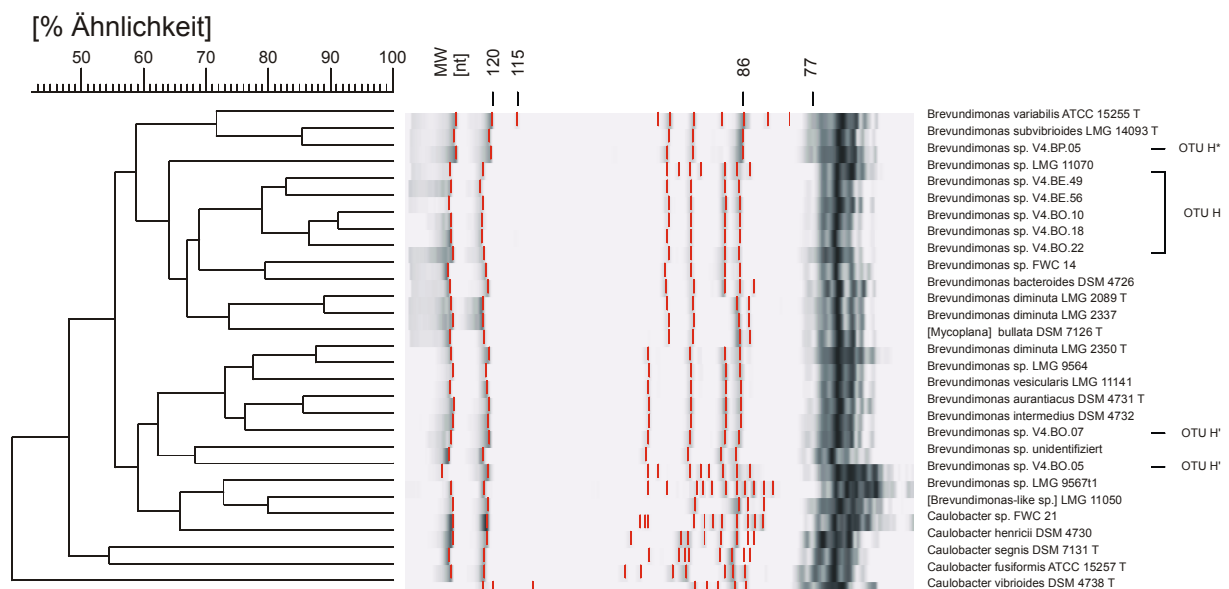


Abbildung 40: Darstellung der Ähnlichkeiten der LMW – RNA Profil - Bandenmuster in Dendrogrammform. Abgebildete Gelstreifen sind normalisiert. In die Berechnungen einbezogen wurde der Bereich zwischen 128 und 80 nt. Die Berechnung der Ähnlichkeitsmatrix erfolgte nach (Pearson, 1926), die Clusteranalyse wurde mittels UPGMA durchgeführt.

LMW – RNA Analysen zeigten, daß sich die untersuchten Vertreter des Genus *Brevundimonas* sehr gut mit Hilfe von LMW – RNA Profilanalysen charakterisieren lassen. Die untersuchten Stämme verteilen sich hinsichtlich der Ähnlichkeiten ihrer 16S rRNA – Gene über den Genus *Brevundimonas*, weisen aber im Vergleich der LMW - RNA Profil meist nicht mehr als zwei unterschiedliche Banden auf. Fünf LMW-RNA Profiltypen ließen sich innerhalb dieses Genus unterscheiden. Bevor die Charakterisierung dieser fünf Typen dargestellt wird, ein Hinweis: Im Folgenden werden zur Charakterisierung dieser fünf LMW –

RNA - Profiltypen absolute Bandenpositionen der Klasse II tRNAs angegeben. Da bei einzelnen Banden gelbedingte Unterschiede im Laufverhalten von  $\pm 1$  nt auftreten können, ist es erfahrungsgemäß sinnvoll, für Vergleiche nicht absolute Unterschiede (z.B. *Bande bei 85 nt*) sondern relative Unterschiede (z.B. *2 nt Abstand* zwischen beispielsweise der 85 und 83 nt Bande) der Bandenpositionen zu Vergleichen heranzuziehen. Im Folgenden eine kurze Charakterisierung der fünf LMW – RNA – Profiltypen:

- ***Brevundimonas vesicularis* Typ** (Klasse II tRNAs mit 96, 92, 88 und 86 nt) mit *Brevundimonas vesicularis*, *Brevundimonas aurantiacus*, *Brevundimonas intermedius*, den *Brevundimonas* sp. LMG 9564 und LMG 9567t1 sowie der OTU H<sup>c</sup> mit den Stämmen V4.BO.05 und V4.BO.07
- ***Brevundimonas* OTU H Typ** (Klasse II tRNAs bei 94, 92, 88 und 86 nt) mit den mediterranen Isolaten der OTU H sowie dem Stamm *Brevundimonas* sp. LMG 11070
- ***Brevundimonas bacteroides* Typ** (Klasse II tRNAs bei 94, 92, 88, 86 und 84 nt) mit *Brevundimonas bacteroides* als einzigem Vertreter.
- ***Brevundimonas variabilis* Typ** (Klasse II tRNA bei 94, 92, 88, 86 und 82 nt) mit *Brevundimonas variabilis*
- ***Brevundimonas diminuta* Typ** (Klasse II tRNA bei 94, 92, 87, 86 und 85 nt) mit zwei Gruppen, die sich hinsichtlich des Laufverhaltens der 87, 86 und 85 nt – Banden geringfügig unterscheiden (siehe Abbildung 39): Der erste Subtyp wird gebildet durch *Brevundimonas diminuta* und den Typstamm von [*Mycoplana*] *bullata*, DSM 7126. Subtyp zwei konstituiert sich aus *Brevundimonas subvibrioides* und der OTU H\* mit dem Stamm V4.BP.05.

Durch Vergleich der LMW – RNA Profiltypen mit einem Dendrogramm, das aufgrund von Ähnlichkeitsvergleichen der 16S rRNA – Gene erstellt wurde, sollte geklärt werden, inwiefern beide Methoden Aussagen zur Phylogenie ermöglichen. In Abbildung 41 werden die Verwandtschaftsbeziehungen, die anhand von Analysen der 16S rRNA – Gene sowie der LMW – RNA – Profile verglichen. Tabelle 16 stellt die Ähnlichkeiten der 16S rRNA Gensequenzen von Vertretern der Gattungen *Brevundimonas* und *Caulobacter* in Matrixform dar.

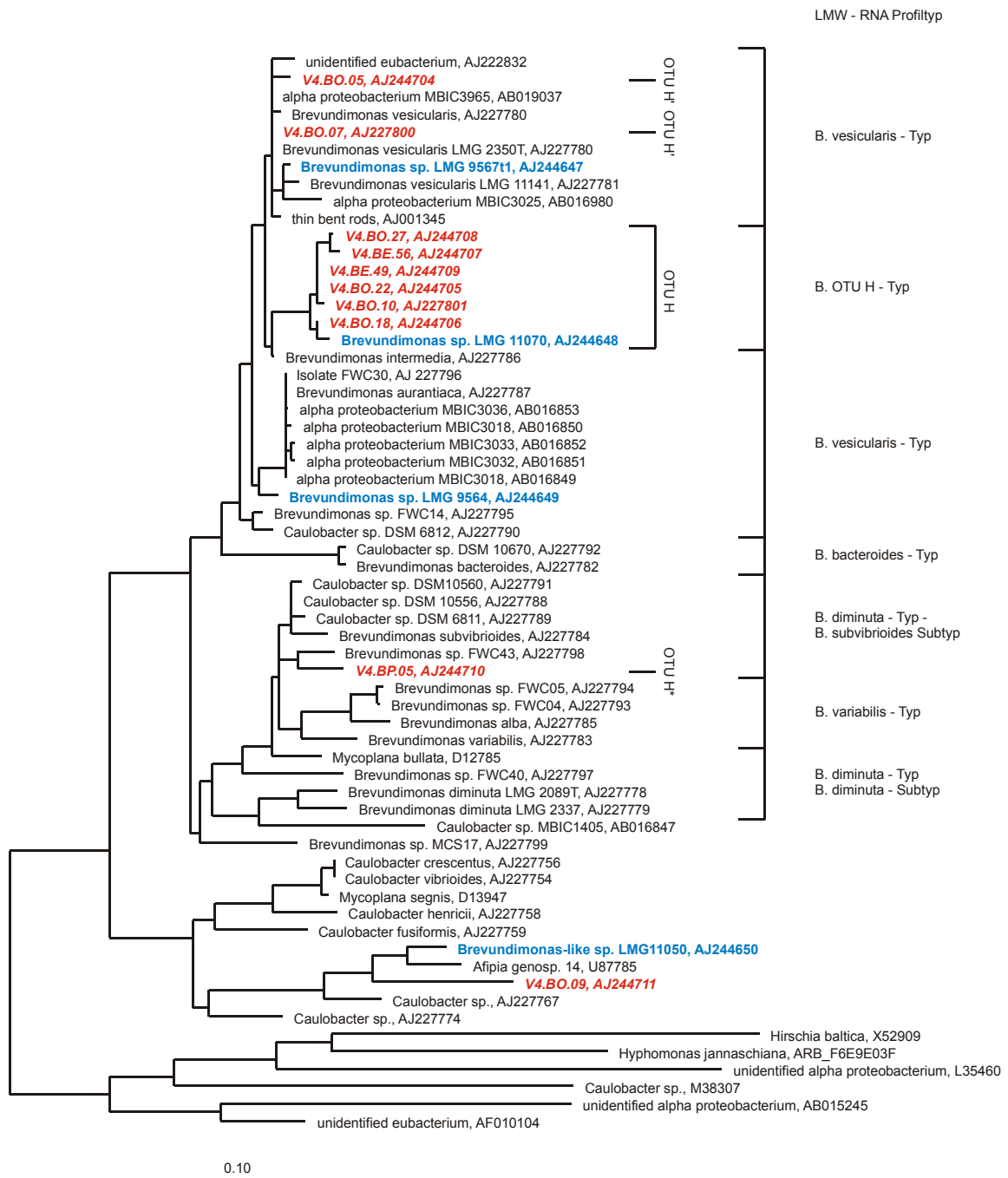


Abbildung 41: Ähnlichkeitsdendrogramm basierend auf 16S rRNA Gensequenzen der Genera *Brevundimonas* und *Caulobacter*. In die Berechnung einbezogen wurden Positionen, die in mindestens 50 % aller Sequenzen konserviert waren. Korrektur für multiple Substitutionen nach (Jukes & Cantor, 1969), Berechnung des Dendrogrammes nach (Fitch & Margoliash, 1967). LMW – RNA Profiltypen haben putativen Charakter, da nicht alle im Dendrogramm aufgeführten Stämme einer LMW – RNA – Profilanalyse unterzogen wurden. Mittelmeer – Isolate sind durch fette und kursive Schrift optisch hervorgehoben, die Sequenzen von vier weiteren, im Rahmen dieser Untersuchung sequenzierten Stämmen sind durch fette Schrift markiert. 16S rRNA Referenzsequenzen der aufgeführten *Brevundimonas* – Arten stammen von den jeweiligen Typstämmen der betreffenden Spezies.

[illegible]

Tabelle 16 (Seite 130): Differenz- (oberes Matrixdreieck) und prozentuale Ähnlichkeitsmatrix (unteres Dreieck) der 16S rRNA – Gene von Vertretern der Genera *Brevundimonas* und *Caulobacter* sowie von mediterranen Isolaten, die zu diesen Genera verwandt sind. Abkürzungen: B.aura, *Brevundimonas aurantiacus*; B.bact, *Brevundimonas bacteroides*; B.dimin, *Brevundimonas diminuta* LMG 2089 T; B.interm, *Brevundimonas intermedia*; B.subv, *Brevundimonas subvibrioides*; B.vari, *Brevundimonas variabilis*; B.vesic, *Brevundimonas vesicularis* LMG 2350 T; Cb.cres, *Caulobacter crescentus*; Cb.fusif, *Caulobacter fusiformis*, Cb.henr, *Caulobacter henricii*; Cb.segn, *Caulobacter segnis*; Cb.vibr, *Caulobacter vibrioides*, FWC 14, *Brevundimonas* sp. FWC 14; LMG 9564, LMG 9567 und LMG 11070 sind *Brevundimonas* sp.; LMG 11050 ist ein Verwandter der *Caulobacter sensu stricto*; [M]bull, [*Mycoplana*] *bullata* DSM 7126 T. Der Matrix liegen die Sequenzdaten zugrunde, deren Ähnlichkeitsverhältnisse im Dendrogramm (Abbildung 41) dargestellt wurden. Ähnlichkeiten beziehen sich auf die im Dendrogramm (Abbildung 41) mit ihrer jeweiligen EMBL Accession – Nr. angegebenen Sequenzen von Typstämmen der betreffenden Arten.

Inwiefern aber repräsentieren Unterschiede in den LMW – RNA Profilen und den 16S rRNA – Gensequenzen Unterschiede in den physiologischen Leistungen der untersuchten Stämme? Um Hinweise darauf zu erhalten, wurden die nahe verwandten OTUs H, H' und H\* durch Substratverwertungstests näher charakterisiert. Diese Gruppe erschien aus folgenden Gründen als interessant für weitere Untersuchungen:

- Die verschiedenen OTUs besitzen sehr ähnliche LMW – RNA – Profile, die sich nur in einer bzw. zwei Banden voneinander unterscheiden.
- Sequenzvergleiche der 16S rRNA – Gene zeigen, daß die OTUs Ähnlichkeiten von mehr als 97 % aufweisen.
- Makroskopisch besitzen die einzelnen OTUs unterschiedliche Koloniemorphologien und lassen sich anhand ihrer Pigmentierung deutlich voneinander unterscheiden. Auf MB – Agar sind die Kolonien der OTU H nicht pigmentiert bzw. weisen lediglich in der Koloniemitte eine schwach braune Pigmentierung auf, OTU H' besitzt leuchtend rote und OTU H\* braune Pigmente.
- Mikroskopisch erscheinen die Zellen der OTU H als flexible, teilweise knospende Langstäbchen, OTU H' besitzt die für *Brevundimonas vesicularis* charakteristische Kurzstäbchenform.
- Auf den MB – Agarplatten (nicht aber auf den mit Methanol supplementierten), die mit dem Proben beimpft worden waren, schien es in einzelnen Tiefenstufen zu einem gehäuften Auftreten von Kolonien mit der für OTU H charakteristischen Koloniemorphologie zu kommen. In diesen Tiefenstufen trugen Kolonien mit der für OTU H charakteristischen Koloniemorphologie (cremeweiße, in der Koloniemitte leicht bräunlich pigmentierte Kolonien, weiche, schleimige Konsistenz, , Ø 2 - 5mm, leicht gewölbte, glänzende, Oberfläche und glatter Rand) zu mehr als der Hälfte der Gesamtzahl der CFUs bei, während in anderen Tiefenstufen Kolonien mit dieser Morphologie nahezu überhaupt nicht gefunden wurden (siehe Abbildung 42). Verschiedene, zufällig ausgewählte Kolonien mit dieser Koloniemorphologie wurden auf ihre taxonomische Position getestet. Alle dieser untersuchten Kolonien waren der OTU H zuzuordnen. Weder für OTU H' noch für OTU H\* konnte ein solches Massenaufkommen in einzelnen Tiefenstufen festgestellt werden.



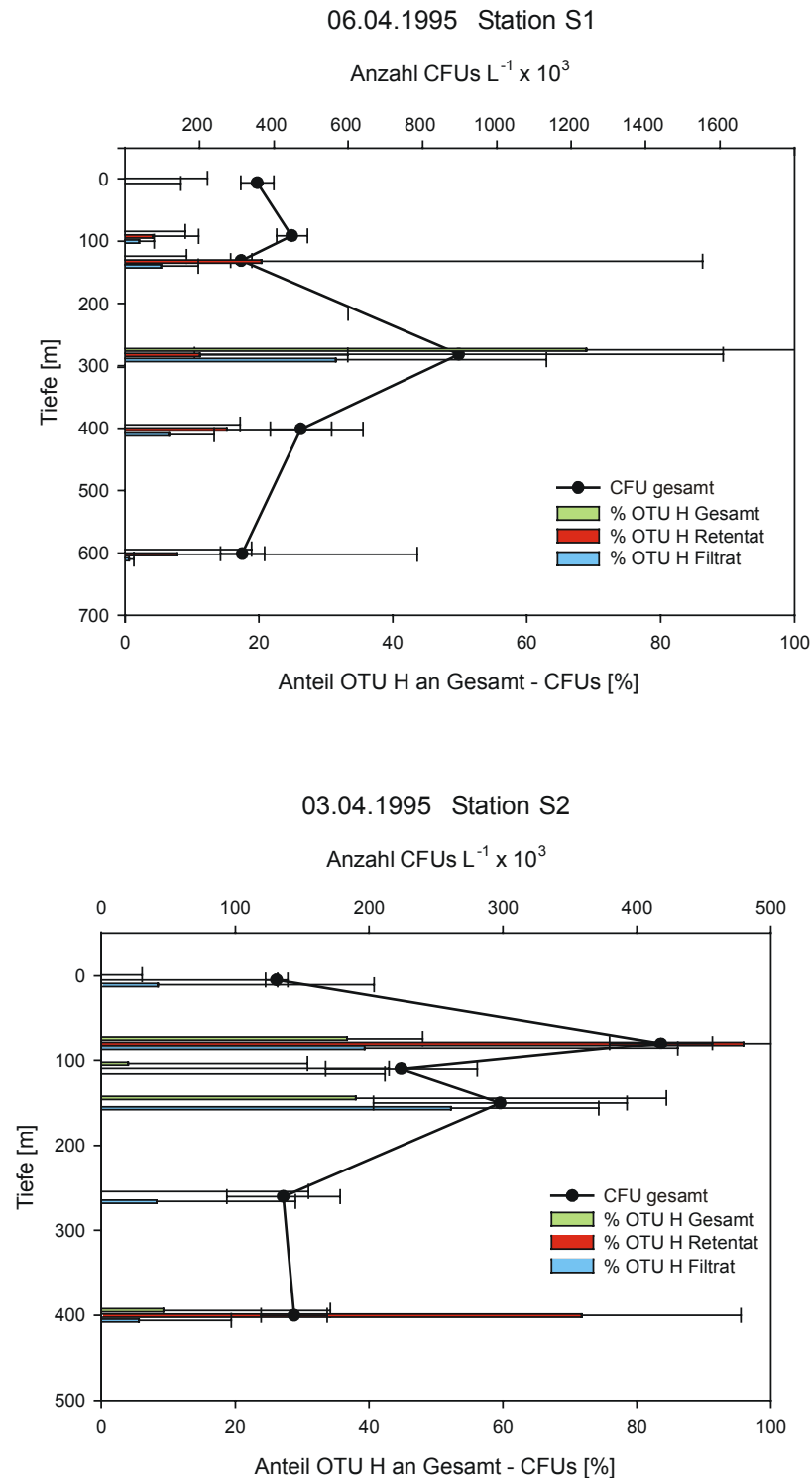


Abbildung 42: Prozentualer Anteil von Kolonien mit der für OTU H charakteristischen Koloniemorphologie an der Gesamtzahl der CFUs.

Zunächst wurden die Stämme dieser OTU auf physiologische Charakteristika untersucht. Tests beinhalteten Substratverwertungstests (API - Teststreifen: Test auf Wachstum in Minimalmedium; BIOLOG). Insgesamt wurden 159 Substrate auf ihre Verwertbarkeit getestet.



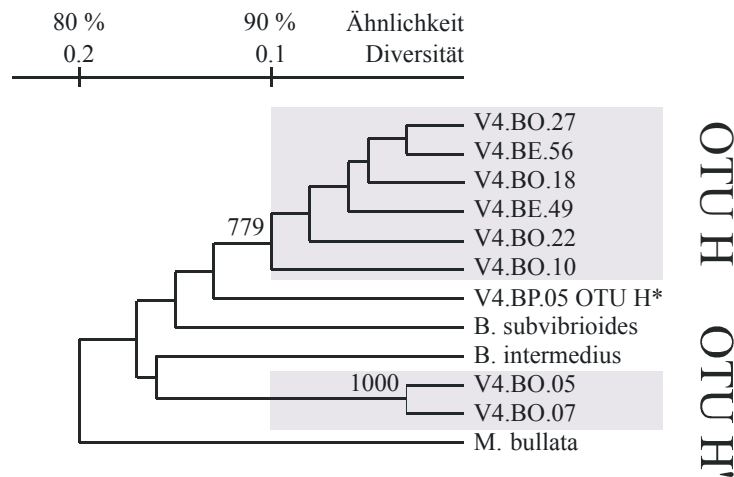


Abbildung 43: Ähnlichkeit der Substratspektren isolierter *Brevundimonas* - Stämme anhand von 159 Substratverwertungstests. Positive bzw. negative Testergebnisse wurden in einer Binärmatrix codiert. Eine Clusteranalyse wurde mit dem Programmpaket Treecon (Version 1.3) (Van de Peer & De Wachter, 1994) wie folgt durchgeführt: Distanzen wurden nach (Nei & Li, 1979) berechnet, die Anzahl der Bootstrap – Wiederholungen betrug 1000, der Clusterung Algorithmus war UPGMA. Alle Bootstrap – Werte über 70 % sind angegeben. Abkürzungen: B., *Brevundimonas*; M., [*Mycoplana*]

Durch APIZYM - Teststreifen wurde das Spektrum konstitutiv exprimierter Enzyme getestet. Die zu testenden Stämme wurden auf EM – Medium, einem nährstoffreichen Komplexmedium, herangezogen und vor dem Test in 1 % [w/v] Natriumchloridlösung suspendiert. Die Tests wurden durchgeführt, wie in Abschnitt 2.2.3.4.4.2 beschrieben.

Konstitutives Enzym	Esterase-Lipase (C 8)	$\alpha$ -Glucosidase	$\beta$ -Glucosidase	Cystin-Arylamidase	Naphtol-AS-BI-Phospho-hydrolase	Valin-Arylamidase	Chymotrypsin
V4.BO.05	+	+	-	-	+	+	-
V4.BO.07	+	+	-	-	+	+	-
<sup>1</sup> <i>B.vesicularis</i>	+	+	-	-	nd	+-	-
<sup>1</sup> LMG9564	+	+	+	-	nd	nd	nd
<sup>1</sup> LMG9567t1	-	+	-	-	nd	nd	nd
<sup>1</sup> LMG11070	+	+	+	-	nd	nd	nd
OTU H	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	-	+	+	-
<i>B.intermedius</i>	+	+	+	-	+	+	+
V4.BP.05	+	-	-	+	-	+	-
<sup>1</sup> <i>B.diminuta</i>	+	-	-	-	nd	-	+-
<i>B.subvibrioides</i>	+	+	-	+	+	+	+
[M]. <i>bullata</i>	+	+	-	+	+	+	+

Tabelle 17: Differenzierung der *Brevundimonas* - Taxa anhand ihrer konstitutiven Enzymaktivitäten. Bestimmung erfolgte durch ApiZym - Teststreifen. Abkürzungen: B., *Brevundimonas*, [M], [*Mycoplana*]; +, konstitutive Aktivität vorhanden; - konstitutive Aktivität nicht vorhanden; +- Aktivität in einigen Stämmen inklusive des Typstammes; +-, Aktivität in einigen Stämmen, exclusive des Typstammes; <sup>1</sup>, Daten aus (Segers *et al.*, 1994a); <sup>2</sup>, negativ für V4.BO.18; nd, keine Daten verfügbar bzw. nicht bestimmt; LMG9564, LMG9567t1, LMG11050 und LMG11070, LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien) - Stammsammlungsnummer von *Brevundimonas* sp. bzw. *Brevundimonas* - like sp. (LMG11050) - Stämmen.

Immer vorhanden waren die folgenden Enzymaktivitäten: Alkalische Phosphatase, Leucin – Arylamidase und Trypsin. Fast bei allen Stämmen vorhanden waren: Saure Phosphatase (nicht bei V4.BP.05) und Esterase Lipase [C8] (nicht bei LMG9567t1). Bei allen in dieser Untersuchung getesteten Stämmen wurde Esterase [C4] – Aktivität nachgewiesen. Nie vorhanden waren die folgenden Aktivitäten: Lipase [C14],  $\alpha$  - Galactosidase,  $\beta$  - Glucuronidase,  $\beta$  - Galactosidase (bis auf *Caulobacter intermedius*), N – Acetyl - Glucosaminidase,  $\alpha$  - Mannosidase und  $\alpha$  - Fucosidase. Die Tests auf Enzymaktivitäten erbrachten für alle Isolate aus OTU H identische Ergebnisse, mit folgender Ausnahme: V4.BO.18 besaß, im Unterschied zu allen anderen Stämmen der OTU H, keine  $\alpha$  - Glucosidase und keine  $\beta$  - Glucosidase – Aktivität.

Eine weitergehende Charakterisierung wurde durch Bestimmung des G+C - Gehaltes durchgeführt.

Spezies	Stamm	G+C-Gehalt	Quelle
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	LMG 2350 T	65,4	(Segers <i>et al.</i> , 1994a)
<i>Brevundimonas vesicularis</i> - ähnlich	LMG 9564	66,4	(Segers <i>et al.</i> , 1994a)
<i>Brevundimonas vesicularis</i> – ähnlich	LMG 9567t1	66,3	(Segers <i>et al.</i> , 1994a)
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H <sup>c</sup>	V4.BO.05	66,8	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H <sup>c</sup>	V4.BO.07	66,2	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H – ähnlich	LMG 11070	67	(Segers <i>et al.</i> , 1994a)
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H	V4.BO.10	67,4	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H	V4.BO.18	67,4	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H	V4.BO.22	67,1	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H	V4.BO.27	67,3	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H	V4.BE.49	67,5	eigene Bestimmung
<i>Brevundimonas sp.</i> OTU H*	V4.BP.05	64,6	eigene Bestimmung
<i>Mycoplana bullata</i>	ATCC 4278T	66,7	(Urakami <i>et al.</i> , 1990)

Tabelle 18: Vergleich des G+C - Gehaltes der DNA untersuchter *Brevundimonas* – Isolate mit den G+C - Gehalten von Referenzstämmen.

Tabelle 19 (Seite 135): Phänotypische Eigenschaften zur Charakterisierung von Vertretern des Genus *Brevundimonas*. Abkürzungen: +, Substrat verwertet bzw. Wachstum (positiv); -, Substrat nicht verwertet bzw. kein Wachstum (negativ); +- einige Stämme inklusive des Typstammes positiv; -+, einige Stämme exclusive des Typstammes positiv; n.d., keine Daten verfügbar bzw. nicht bestimmt; B., *Brevundimonas*; [M.], [*Mycoplana*]; B. Group H, *Brevundimonas sp.* der OTU H; Daten für *Brevundimonas vesicularis*, *Brevundimonas diminuta*, LMG9564, LMG 9567t1, LMG 11050 und LMG11070 entnommen aus (Segers *et al.*, 1994b), Daten für [*Mycoplana*] *bullata* NCIB 9440 entnommen aus (Urakami *et al.*, 1990).

Substrat	B.vesicularis	V4,BO.05	V4,BO.07	LMG9564	LMG9567tl	LMG11070	B. intermedia	B. Group H	V4,BP05	B. subvibrioides	B. diminuta	[M.] bullata DSM 7126	M. bullata NCTB 9440	LMG11050
Gelbes oder orangefarbenes Pigment vorhanden ?	+-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	n.d.	-
Acetyl-Glucosamin N-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Adipat	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	n.d.	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	+
Alanin D-	-+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	+	+	n.d.	n.d.
Alanin L-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	n.d.	n.d.
Amidon	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-	+	n.d.	-	n.d.	n.d.
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	n.d.	+
Arabinose D-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	n.d.	n.d.
Arabinose L-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Arbutin	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	n.d.	+
Asparagin L-	n.d.	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Aspartat L-	-+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	+	+	n.d.	n.d.
Caprat	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	n.d.	-
Cellobiose	-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	-	-	n.d.	n.d.
Dextrin	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.
Fructose D-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Fumarat	+-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	+	-	n.d.	n.d.
Galactose D-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Galacturonat	-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	n.d.	n.d.
Gluconat	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	+	-	-	n.d.	n.d.
Glucosamin D-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Glucose a-D-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Glucose-1-Phosphate	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Glucose-6-Phosphat	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Glutamat L-	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Glycogen	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Glycyl-L-Aspartat	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	+	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Glycyl-L-Glutamat	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.
Histidin L-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	n.d.	-
Hydroxybutyrat b-	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.
Inositol myo-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketobutytrat a-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Keto Valerat a-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Keto-Gluconate, 5-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Lactat DL-	+-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactulose	-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Leucin L-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Malat L(-)-	+-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	-	+	-	n.d.	n.d.
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Maltotriose	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	n.d.	-	n.d.	n.d.
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Mannose D-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-
Melibiose	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Methylpyruvat	n.d.	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	+	+	n.d.	+	n.d.	n.d.
Methyl-b-Glucopyranosid, 1-0-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.
Prolin L-	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.
Propionat	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	n.d.	-
Rhamnose	-+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	-	-	-	+	n.d.	n.d.
Salicin	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	n.d.	+
Sebacat	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	n.d.	+
Serin L-	-+	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	-	-	+	+	n.d.	n.d.
Sorbitol D-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Succinat	+-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	-	-	+	-	n.d.	n.d.
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Threonin L-	-+	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	+	-	+	+	n.d.	n.d.
Trehalose	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Turanose	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	n.d.	n.d.
Tween 40	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Tween 80	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Urocans%ure	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-	-	n.d.	+	n.d.	n.d.
Xylose D-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	n.d.	-

Folglich lassen sich die OTUs H, H' und H\*, obwohl nach Sequenzierung der 16S rRNA - Gene nahe miteinander verwandt (siehe Tabelle 16), phänotypisch deutlich voneinander unterscheiden und differieren möglicherweise auch hinsichtlich ihrer Rolle im Ökosystem. Bemerkenswert ist, daß sich die OTUs H und H' hinsichtlich ihrer 16S rRNA - Gensequenzen um lediglich ca. 1 % unterscheiden. Damit liegen die Unterschiede in etwa an der Grenze der gemäß allgemeiner Übereinkunft akzeptierten Sequenzgenauigkeit internationaler Datenbanken. Nucleinsäuresequenzen können durch Unterschiede der Datenerfassung, -auswertung und -interpretation zwischen verschiedenen Laboren Ungenauigkeiten in etwa dieser Größenordnung aufweisen (Fox, Wisotzkey & Jurtshuk, 1992). Unter anderem zeigte eine Analyse der LMW - RNAs in diesem Fall, daß sich OTU H und H' auf Spezies - Ebene unterscheiden lassen: Während OTU H' offensichtlich der Spezies *Brevundimonas vesicularis* nahesteht, handelt es sich bei den Vertretern von OTU H um eine neue Spezies der Gattung *Brevundimonas*, die sich von allen anderen Spezies dieser Gattung durch ihre LMW-RNA - Profile, durch ihre Substratverwertungsspektren abgrenzen läßt und zudem noch einen leicht höheren G+C- Gehalt im Vergleich zu anderen Vertretern dieses Genus besitzen. Weitere, von anderen Arbeitsgruppen durchgeführte Untersuchungen an diesen Stämmen beinhalten Lipidanalysen (Abraham *et al.*, 1997) und immunologische Untersuchungen an Zelloberflächenproteinen (Tesar *et al.*, 1996), und stützen den oben dargestellten Befund (Abraham *et al.*, 1999).

Es zeigte sich, daß die Isolate von OTU H phänotypisch sehr ähnlich sind, und daß sie sich gegenüber den OTUs H' und H\* sowie anderen Vertretern der Gattung *Brevundimonas* auch morphologisch und physiologisch differenzieren lassen. Die Unterschiede in den LMW - RNA - Profilen beschränken sich auf ein bis zwei unterschiedliche tRNA - Bandenpositionen, in den 16S rRNA Gensequenzen auf 1 % bis 3 %. Somit wurde exemplarisch an der Untersuchung von Isolaten der OTU H, H' und H\* gezeigt, daß die vorgenommene Charakterisierung der Isolate mittels LMW-RNA Profilanalyse in Verbindung mit 16S rRNA Sequenzierung eine taxonomisch sinnvolle Gruppierung der Isolate in OTUs erlaubt, die konsistent mit phänotypischen Daten ist. Diese Befunde deuten auf unterschiedliche Rollen der Vertreter dieser drei OTUs im Ökosystem hin.

## 3.2 Umweltproben

Eine Untersuchung der Probennahmestationen mittels kultivierungsabhängigen Methoden, Isolation, Identifikation und Charakterisierung von Mikroorganismen aus Meerwasserproben der untersuchten Stationen, zeigte eine deutliche Abundanz einzelner Genera in Abhängigkeit von der beprobten Station, der Fraktion (freilebend oder partikelgebunden) und des zur Isolation verwendeten Mediums. Zu klären war nun, inwieweit die Abundanz kultivierbarer Organismen auf eine Abundanz der betreffenden Taxa im Ökosystem schließen läßt und damit eventuell Rückschlüsse auf Parameter zum Zeitpunkt der Probennahme erlaubt.

Entsprechende Untersuchungen wurden in den folgenden Schritten durchgeführt:

- Optimierung von DNA / RNA Extraktionsmethoden zur quantitativen Extraktion von Nucleinsäuren aus Umweltproben.
- Bestimmung der Nucleinsäurekonzentrationen in den Umweltproben und Korrelation mit weiteren, von anderen Arbeitsgruppen an demselben Probenmaterial erhobenen Parametern.
- Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften anhand von verschiedenen Fingerprintmethoden. Zielmoleküle: 5S rRNA (5S rRNA Profilanalyse), 16S rRNA – Gene (DGGE, SSCP)
- Identifikation abundanter Banden durch Ausschneiden aus den molekularen Fingerprints und anschließendes Sequenzieren.

### 3.2.1 Fraktionierte DNA-RNA Extraktion

Eine Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften über die Analyse von Nucleinsäuren aus Umweltproben steht und fällt mit der verwendeten Methode zur Extraktion dieser Nucleinsäuren. Die Extraktionsprozedur gliedert sich in zwei Teilprozeduren, den Zellaufschluß und die Isolierung der gewünschten Nucleinsäuren. Idealerweise soll der Zellaufschluß möglichst vollständig verlaufen, während die isolierten Nucleinsäuren möglichst schonend behandelt werden sollen, um durch allzu harsche physikalische und chemische Bedingungen hervorgerufene Beschädigungen der Nucleinsäuren weitestgehend in Grenzen zu halten. In der Praxis stellt diese Forderung allerdings eine Gratwanderung dar, da Zellen in Umweltproben unterschiedlich leicht zur Lyse zu bringen sind, so daß unter Umständen sich die Nucleinsäuren leicht lysierbarer Bakterien schon in freier Suspension befinden, während für die Extraktion schwieriger aufzuschließender Zellen die Aufschlußprozedur fortgesetzt werden muß. Im Extremfall kann das gewonnene Bild der Biozönosestruktur durch Unterschiede im Zellaufschluß so verfälscht werden, daß bei Anwendung zu harscher Extraktionsbedingungen infolge Beschädigung frühzeitig suspendierter Nucleinsäuren eine Verschiebung der gemessenen Biozönosestruktur zugunsten aufschlußresistenterer Organismen erfolgt, während eine zu sanfte Extraktionsprozedur mangels Zellaufschlusses gewisse Organismengruppen mit stabileren Zellwänden, beispielsweise gram – positive Organismen, nicht oder nicht angemessen erfasst. Insofern stellt eine optimale Extraktionsmethode einen Kompromiß zwischen dem Wünschenswerten

(im Hinblick auf aufschlußresistente Zellen) und dem Machbaren (mit Rücksicht auf frühzeitig suspendierte Nucleinsäuren) dar.

Die Analyse der Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften anhand von LMW – RNA Profilen ist eine PCR – unabhängige Methode, bei der die ermittelte Intensität einzelner, in diesem Falle radioaktiv markierter 5S rRNA - Banden proportional zur in der Bande enthaltenen RNA - Menge ist. Mit dieser Methode ist eine direkte Quantifizierung einzelner 5S rRNA - Banden aus Umweltproben möglich. Allerdings erweist es sich als notwendig, eine möglichst hohe RNA – Menge als Ausgangsmaterial in die Untersuchungen einzusetzen. Da sich aber aus den Umweltproben nur eine geringe Menge an Ausgangsmaterial erwarten ließ, erwies es sich als notwendig, RNA und DNA aus den Umweltproben fraktioniert zu extrahieren. Bei einer Extraktion der Gesamtnucleinsäuren aus Umweltproben käme es nämlich immer dann zu Verlusten an RNA, wenn beispielsweise ein Aliquot zur Durchführung eines PCR – Schrittes entnommen wird, zu dem ja nur die DNA benötigt wird. Solche RNA – Verluste galt es zu vermeiden, indem RNA und DNA schon im Verlaufe der Extraktion fraktioniert werden sollten.

Zur Charakterisierung der Biozönosestruktur war es also erforderlich, eine möglichst einfache, unaufwendige Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe sich RNA und DNA fraktioniert aus Umweltproben extrahieren ließ und zwar mit möglichst hoher Ausbeute und möglichst hohem Reinheitsgrad.

### **3.2.1.1 Optimierung**

Ein Ansatz zur Trennung von RNA und DNA bei der Extraktion besteht darin, die unterschiedliche Löslichkeit von RNA und DNA bei niedrigen pH - Werten zur fraktionierten Extraktion zu nutzen (Majumdar, Avissar & Wyche, 1991), (Farrell, 1993). Während RNA bei niedrigen pH Werten ( $\text{pH} \approx 4$ ) in der wäßrigen Phase einer Phenol- Extraktion in Lösung geht, bleibt DNA unter diesen Bedingungen unlöslich und reichert sich in der Interphase an. Nach Entfernen der RNA - haltigen, sauren wäßrigen Phase und Einstellen des pH - Wertes auf  $\text{pH} \approx 7$  geht DNA in Lösung und kann mit der neutralen wäßrigen Phase entnommen werden. Dieser Ansatz erlaubte es, auf einem bestehenden Protokoll zur RNA - Extraktion aufzubauen und darin eine DNA - Extraktion zu implementieren.

#### **3.2.1.1.1 Detergenzien**

Getestet wurde dieser Ansatz mit zwei Detergenzien, mit SLS (dem bislang für optimal befundenen Detergenz, siehe hierzu Dominik und Höfle (1999), Dominik (1997)) und mit DIVOLAB, einem Substanzgemisch, welches, ursprünglich als Ausgangsmaterial für kommerzielle Reinigungsmittel entwickelt, hervorragende Ergebnisse bei der Extraktion von RNA aus gram - positiven Mycobakterien, deren komplexe Zellwände sehr resistent gegen Extraktionsprozeduren sind, erzielten (Mangan *et al.*, 1997).

Fernerhin wurden zwei kommerzielle Produkte für die DNA - und RNA - Isolation getestet, zum einen InstaPure (TRI InstaPure™, KP-1030, Eurogentec, Seraing, Belgien) und zum anderen RNA / DNA - Isolator (Genosys, Cambridge, UK). Beide kommerziellen Kits basieren auf der Guanidinium - Thiocyanat Extraktion nach Chomczynski (1993), (Chomczynski & Sacchi, 1987).

### **3.2.1.1.2 Extraktionseffizienz**

Die vier Extraktionsmethoden wurden getestet, indem Kulturen von vier eubakteriellen Stämme unterschiedlicher taxonomischer Position und unterschiedlichen Zellwandaufbaus sowie eine Umweltprobe (Wasserprobe aus dem institutseigenen GBF - Teich) mit jeder dieser Methoden extrahiert wurden (siehe Tabelle 20). Um zu testen, ob durch Kontaminationen innerhalb der jeweiligen Extraktionsprozeduren Nucleinsäuren extrahiert werden, die PCR – Ergebnisse verfälschen können, wurde außerdem jeweils ein durch Autoklavieren sterilisierter Filtersandwich als Nullkontrolle extrahiert. Details zur Vorgehensweise bei den Extraktionen sind den Abschnitten 2.3.2.1 und 3.2.1 zu entnehmen. Nach erfolgter Extraktion wurden die erhaltenen DNA – und RNA – Mengen mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe quantifiziert. Zum Vergleich wurde die in den Kulturen vorhandene DNA – bzw. RNA – Menge bestimmt, indem Aliquots aus den vollständig homogen suspendierten Kulturen entnommen wurden, die Zellzahl durch Epifluoreszenzmikroskopie bestimmt wurde, ein weiteres Aliquot der Kultur durch Ultraschallbehandlung lysiert wurde und der DNA – bzw. RNA – Gehalt dieses Lysates bestimmt wurde. Die Vollständigkeit der Lysis nach Ultraschallbehandlung wurde mikroskopisch überprüft. Der DNA – und RNA – Gehalt der durch Ultraschall lysierten Zellkulturen wurde als 100 % gesetzt und die Extraktionseffizienz der verschiedenen Methoden als Prozentsatz der Nucleinsäuremenge bestimmt, die nach Extraktion mit der jeweiligen Methode im Vergleich zum Ultraschall – Lysat erhalten wurde. Die jeweiligen DNA – Mengen wurden aus der Differenz der Fluoreszenzen der Extrakte vor und nach DNase - Verdau bestimmt, RNA – Mengen ergaben sich analog aus der Differenz unbehandelter und RNase verdauter Extrakte. die Weitere Details zur Vorgehensweise finden sich in Weinbauer et al. (2000).

Spezies	Stamm	Taxo- nomische Gruppe	RNA total [µg]	DNA total [µg]	Zell- zahlen x 10 <sup>9</sup>	RNA Konzen- tration (fg/Zelle)	DNA Konzen- tration (fg/Zelle)	RNA / DNA Verhält- nis
<i>Arthrobacter globiformis</i>	DSM 20124T	<i>Actino- bacteria</i>	17,27	2,618	2,2	78,5	11,9	6,6
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	DSM 2064T	gram -, C/F	14,467	1,904	1,7	85,1	11,2	7,6
<i>Escherichia coli</i>	DSM 613	gram -, γ-Proteo.	9,269	1,287	1,3	71,3	9,9	7,2
<i>Ralstonia eutropha</i>	DSM 531T	gram -; β-Proteo.	14,722	1,938	1,7	86,6	11,4	7,6
GBF – Teich	-	Umwelt- probe	1,918	0,546	1,4	13,7	3,9	3,5

Tabelle 20: Extrahierbarer DNA – und RNA – Gehalt ausgewählter Bakterienstämme. RNA – und DNA – Menge (total) beziehen sich auf Aliquots der Kulturen, welche die in der Spalte Zellzahlen aufgeführte Anzahl an Zellen besaßen. Daten sind entnommen aus Weinbauer et al. (2000).

Ein Vergleich der Extraktionseffizienzen zeigte, daß die Ausbeute an extrahierbarer DNA und RNA für die Divolab – und SLS – Methoden in allen Fällen deutlich höher waren als die beiden kommerziellen Versionen der Guanidinium – Thiocyanat – Methode (siehe Abbildung 44). Für den gram – positiven Vertreter *Arthrobacter globiformis* betrug die DNA – und RNA - Extraktionseffizienz 20 - 30 % für die SLS – Methode, ca. 20 % für die Divolab – Methode und lag für die beiden Guanidinium- Thiocyanat basierten Methoden deutlich unter 20 %. Die Nucleinsäuren der gram – negativen Vertreter konnten mittels der SLS – und der Divolab – Methode mit hohen Effizienzen von ca. 50 % bis zu ca. 65 % extrahiert werden, während mit Hilfe der beiden Guanidinium – Thiocyanat basierten Methoden nur ca. 20 % bis 35 % der DNA und RNA erhalten wurden. Auch bei der Probe aus dem freien Wasserkörper des GBF – Teiches bestätigte sich dieser Trend: SLS – und Divolab – extrahierte Proben erlaubten die Gewinnung von ca. 50 % bis ca. 65 % der gesamten Nucleinsäuren, die Effizienz der beiden übrigen Methoden lag mit Effizienzen zwischen ca. 20 % und 35 % deutlich darunter.

Die Extraktionseffizienzen der Divolab – und der SLS – Methode stimmten im Rahmen der bei Extraktionsprozeduren erreichbaren Genauigkeiten weitgehend überein. Da aufgrund der geringen Extraktionseffizienzen der beiden Guanidinium – Thiocyanat – Methoden eine höhere Extraktionsselektivität gegenüber den beiden anderen Methoden nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden weitere Untersuchungen nur noch mit den SLS – und Divolab – Extrakten durchgeführt. Nun galt es zu klären, welche der beiden Methoden, SLS oder Divolab, als Extraktionsmethode der Wahl für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden sollte. Deswegen wurden die mit den beiden Methoden gewonnenen Extrakte als Ausgangsmaterial für verschiedene PCR – basierte Techniken eingesetzt.



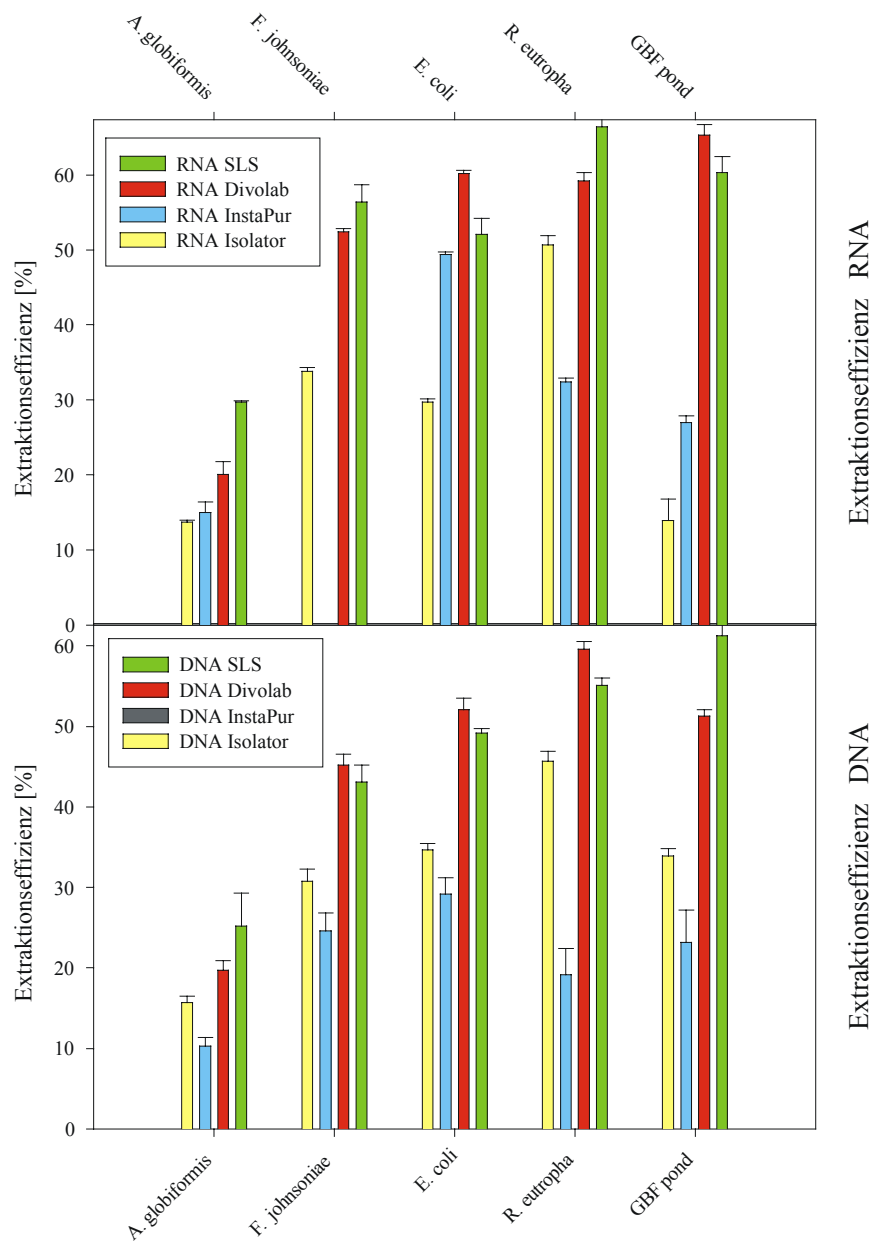


Abbildung 44: DNA – und RNA – Extraktionseffizienzen der getesteten Methoden für verschiedene Bakterienspezies und eine komplexe Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen. Daten sind entnommen aus Weinbauer et al. (2000).

### 3.2.1.1.3 PCR-Amplifikation

Extrahierte DNA und RNA wurde hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in molekularbiologischen Untersuchungen getestet. Dazu wurden Aliquots der DNA - Extrakte von Isolaten und Umweltpuben mit dem Primerpaar 16-F-27 und 16-R-1525 zu den in Abschnitt 2.3.1.2.1.3 angegebenen Bedingungen amplifiziert. Die eingesetzten DNA - Aliquots aus den Umweltpuben entsprachen der aus 125 ml Teichwasser extrahierten DNA-Menge. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 45 dargestellt.

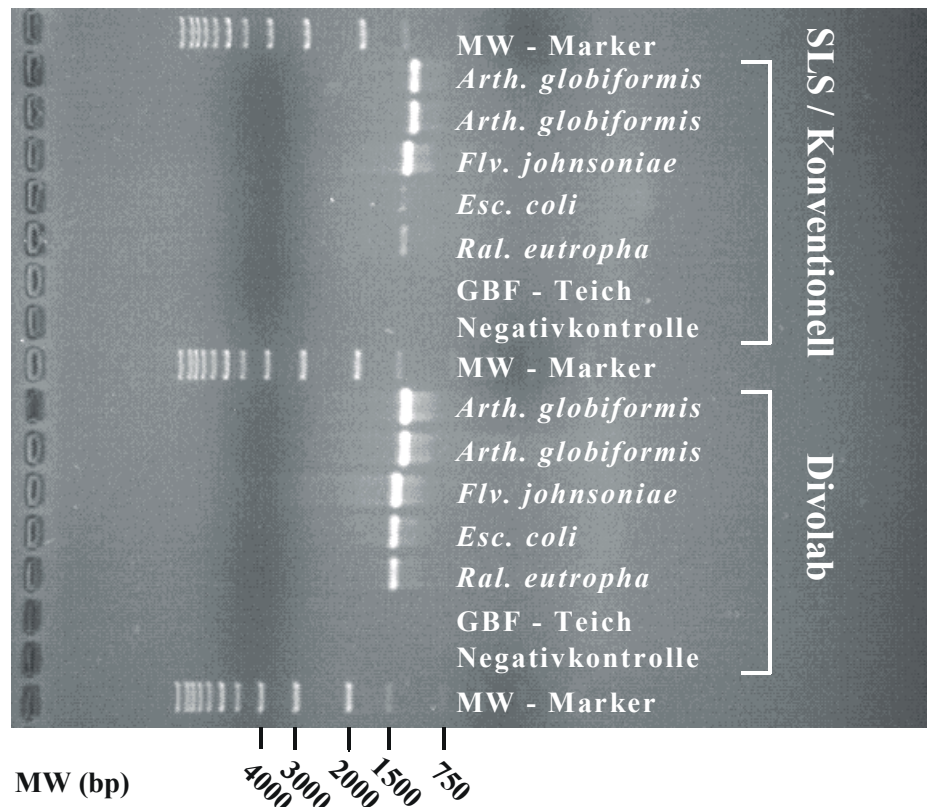


Abbildung 45: Test auf Amplifizierbarkeit von 16 S rRNA Genen aus DNA, extrahiert nach der oben beschriebenen Methode mit den Detergenzien SLS und Divolab. Amplifikation erfolgte mit den Primern 16-F-27 und 16-R-1525. Negativkontrollen sind Extrakte von Filtern ohne Bakterien. Abkürzungen: Arth., *Arthrobacter*; Flv., *Flavobacterium*; Esc., *Escherichia*; Ral., *Ralstonia*. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Es zeigte sich, daß sich mit der DNA von Referenzstämmen, die mit SLS bzw. mit Divolab extrahiert wurde, Amplifikationsprodukte gewinnen ließen. Allerdings zeigten die Amplifikationsprodukte SLS extrahierter DNA - Proben im Ethidium - Bromid gefärbten Agarose - Gel deutlich schwächere Banden als die entsprechenden DNA - Banden Divolab - extrahierter DNA. DNA aus Umweltproben ließ sich bei der eingesetzten DNA - Menge nicht amplifizieren. PCR - Produkte aus den Negativkontrollen, Extrakte von autoklavierten Filtersandwiches, wurden nicht erhalten.

Um zu klären, ob inhibierende Substanzen in den DNA - Extrakten der Umweltproben, z.B. Huminsäuren, mit der PCR - Amplifikation interferieren, wurden Verdünnungen der DNA - Extrakte vorgenommen. Ausgangspunkt war die Überlegung, daß es möglicherweise eine optimale Konzentration gibt, bei der die Umwelt - DNA konzentriert genug für eine zufriedenstellende Amplifikation vorliegt, die Konzentration der PCR - inhibierenden Substanzen jedoch gering genug ist, um störende Einflüsse auf die Amplifikation weitgehend auszuklammern. Zu diesem Zweck wurden sukzessive vier Verdünnungen in Zehnerschritten, ausgehend von 1 µl DNA - Extrakt, angefertigt. 1 µl des DNA - Extraktes (im folgenden als 1:1 verd. Lsg. definiert) entsprachen der extrahierten DNA aus 25 ml Teichwasserprobe bzw. einer DNA Menge zwischen 13 ng und 3 ng in den jeweils am geringsten verdünnten PCR -

Ansätzen. Von den SLS und Divolab - Extrakten wurde je 1 µl einer 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnten Lösung in einem PCR - Ansatz eines Volumens von 50 µl eingesetzt, um den Einfluß PCR - inhibierender Substanzen auf die Amplifikation zu klären. In Abbildung 46 findet sich das Ergebnis dieses PCR - Experimentes.

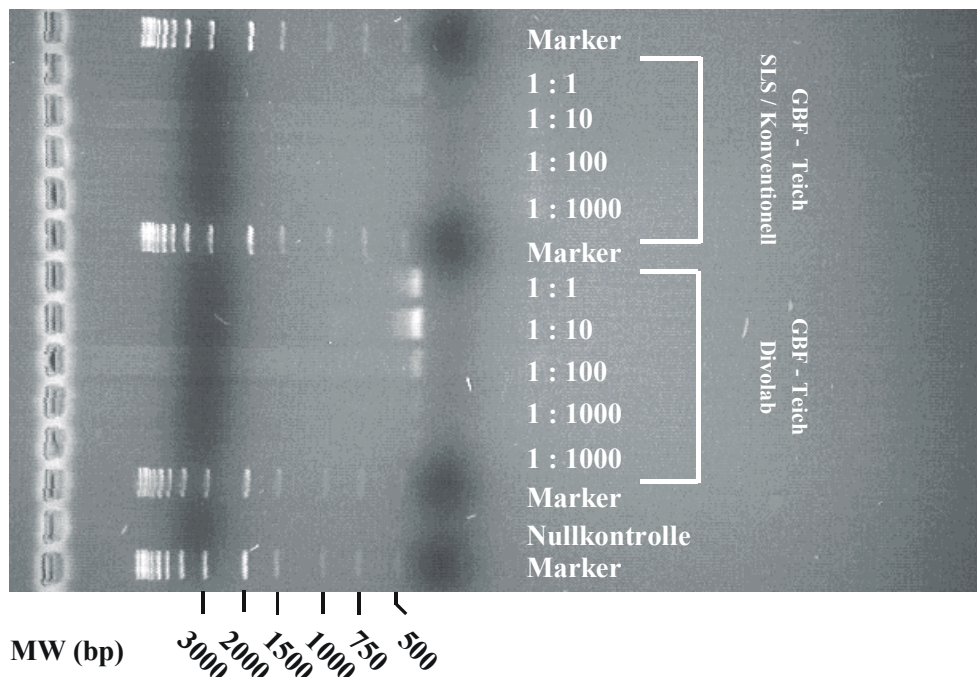


Abbildung 46: Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen DNA - Menge für die Amplifikation von 16 S rRNA - Genfragmenten aus Umwelt - DNA. Amplifiziert wurde mit dem Primerpaar GC-16-F-985 und 16-R-1385, für das ein Amplifikationsprodukt mit einer Länge von ca. 460 bp erwartet wurde. Zur Definition der Verdünnungen siehe obigen Text.

Es wurde in diesem Experiment deutlich, daß Unterschiede in der Amplifizierbarkeit der mit SLS extrahierten Proben einerseits und der Divolab - Proben andererseits bestehen. Während mit SLS extrahierte Proben lediglich in der 1:1 und 1:10 Verdünnung sehr schwache Banden zeigten, ließen sich aus den Divolab - Extrakten in der 1:1, 1:10 und 1:100 - Verdünnungsstufe kräftige Amplifikationsprodukte gewinnen und selbst in der 1:1000 - Verdünnungsstufe waren noch Banden mit einer vergleichbaren Intensität wie die SLS - 1:1 und 1:10 - Amplifikationsprodukte nachzuweisen. Eine optimale Amplifikation, gemessen an der Stärke des PCR - Produktes, wurde bei der Divolab - Verdünnungsstufe 1:10 erzielt.

Das Ergebnis dieses PCR - Experimentes läßt sich dahingehend interpretieren, daß zwar eine Proportionalität zwischen eingesetzter DNA - Menge und PCR - Produkt besteht, jedoch macht sich ab einer bestimmten eingesetzten DNA - Menge der Einfluß PCR - inhibierender Substanzen zunehmend bemerkbar. Insgesamt ist die Qualität der extrahierten DNA aus Umweltproben mit der Divolab - Methode offensichtlich ausreichend, um sie ohne weitere Aufreinigungsschritte in eine PCR - Reaktion einzusetzen, wenn in einem Vorversuch eine

Verdünnung für die DNA - Extrakte bestimmt wird, um das Amplifikationsoptimum zu erzielen.

#### **3.2.1.1.4 RT-PCR-Amplifikation**

Die isolierte RNA sollte ebenfalls auf ihre Verwendbarkeit für molekularbiologische Untersuchungen getestet werden. Die Einsatzfähigkeit der mit diesem Protokoll gewonnenen RNA für radioaktive 3'- Endmarkierung und für LMW - RNA - Profile wurde bereits von anderen gezeigt (Dominik & Höfle, 1999). In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob sich die extrahiererte RNA mit Reverser Transcriptase (RT) in DNA zurückschreiben läßt. Dazu wurde ein RNA - Aliquot entnommen, welches der extrahierbaren RNA – Menge des 0,03fachen Probenvolumens entsprach (je nach Ausgangskonzentration 500 ng bis 16 ng RNA je RT – PCR Ansatz), mit RNase freier DNase verdaut und nach Reinigung durch Phenol - Chloroform - Extraktion und kurzer Hitzebehandlung zur Beseitigung verbliebener DNase - Aktivität in die RT - Reaktion eingesetzt. Bezüglich der Teichwasserprobe entsprach das RNA - Aliquot der extrahierbaren RNA - Menge aus 170 ml Teichwasser.

Zunächst wurde versucht, mit dem Primerpaar 16-F-27 und 16-R-1492 ein nahezu vollständiges 16S rRNA - Genfragment zu amplifizieren. Jedoch ließ sich weder mit einer direkten Amplifikation unter Verwendung thermostabiler reverser Transkriptase (Thermostable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kit, Perkin Elmer N0808-0069, nach Anleitung des Herstellers eingesetzt) mit den spezifischen Primern (d.h. spezifische reverse Transkription lediglich der 16 S rRNA) noch nach reverser Transkription mit Random Hexamer - Primern (d.h. reverse Transkription der Gesamt - RNA) und anschließender PCR - Amplifikation, wie in Abschnitt 2.3.2.4.1.5. beschrieben, für alle Proben ein PCR - Produkt gewinnen. Lediglich für zwei SLS - extrahierte Reinkulturen wurde mit rTth – Polymerase ein schwaches Produkt erhalten.

Daß die Gründe für das Versagen der Reaktion für die SLS - und die Divolab - extrahierten Proben unterschiedlich waren, wurde nach Auftragen des Produktes der Reversen Transcriptase deutlich: Die cDNA, welche für die anschließende PCR - Reaktion als Template - DNA dient, wurde bei den SLS - extrahierten Proben nicht oder nur sehr schwach gebildet, während bei den Divolab - Extrakte offensichtlich große Mengen an cDNA gebildet wurden. Die cDNA, da nicht von definierter Größe, war im Agarosegel erkennbar an einem "Schmier", der sich durch das Gel zieht. Im Falle der rTth - Transkriptase waren alle Bereiche des "Schmiers" kleiner als 1300 bp (Abbildung nicht gezeigt). Somit waren keine cDNA - Fragmente einer Länge von mehr als 1300 bp vorhanden, was erklärt, warum ein mit dem Primerpaar 16-F-27 und 16-R-1492 zu amplifizierendes Fragment mit einer erwarteten Größe von ca. 1470 nt nicht erhalten wurde. Eine Amplifikation mit Random - Hexameren zeigte, daß der "Schmier" in diesem Falle auch den Bereich von 1500 nt abdeckte (siehe Abbildung 47), so daß prinzipiell mit diesem Protokoll 1500 nt große Genfragmente amplifiziert werden könnten. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, daß bei Einsatz des rTth - RT - Protokolls spezifisch nur 16S rRNA retranskribiert wurde, das Random - Hexamer - Protokoll jedoch die Gesamt - RNA in DNA zurückschreibt, so daß es im letzteren Fall aufgrund der Betrachtung

der Größenverteilung retranskribierter RNA nicht möglich ist, abzuschätzen, ob nahezu vollständige 16S cDNA - Fragmente im cDNA - Pool vorliegen.

Eine mögliche Ursache für einen vorzeitigen Abbruch der reversen Transkription können modifizierte Nucleotide sein, wie die Nucleotide 966 und 967 der 16S rRNA (Weller *et al.*, 1991a), (Teske *et al.*, 1996). Es wurde gezeigt, daß eine RT - PCR, ausgehend von Random - Hexamer - Primern effizienter ist, als mit spezifischen Primern (Kawasaki, 1990). Um zu klären, ob eine Amplifikation partieller 16S Fragmente aus Gesamt - cDNA möglich war, wurde eine PCR - Amplifikation mit dem Primer - Paar GC-16S-F-985 und 16S-R-1385 durchgeführt. Als Nullkontrollen wurden Extrakte autoklavierter Filtersandwiches eingesetzt.

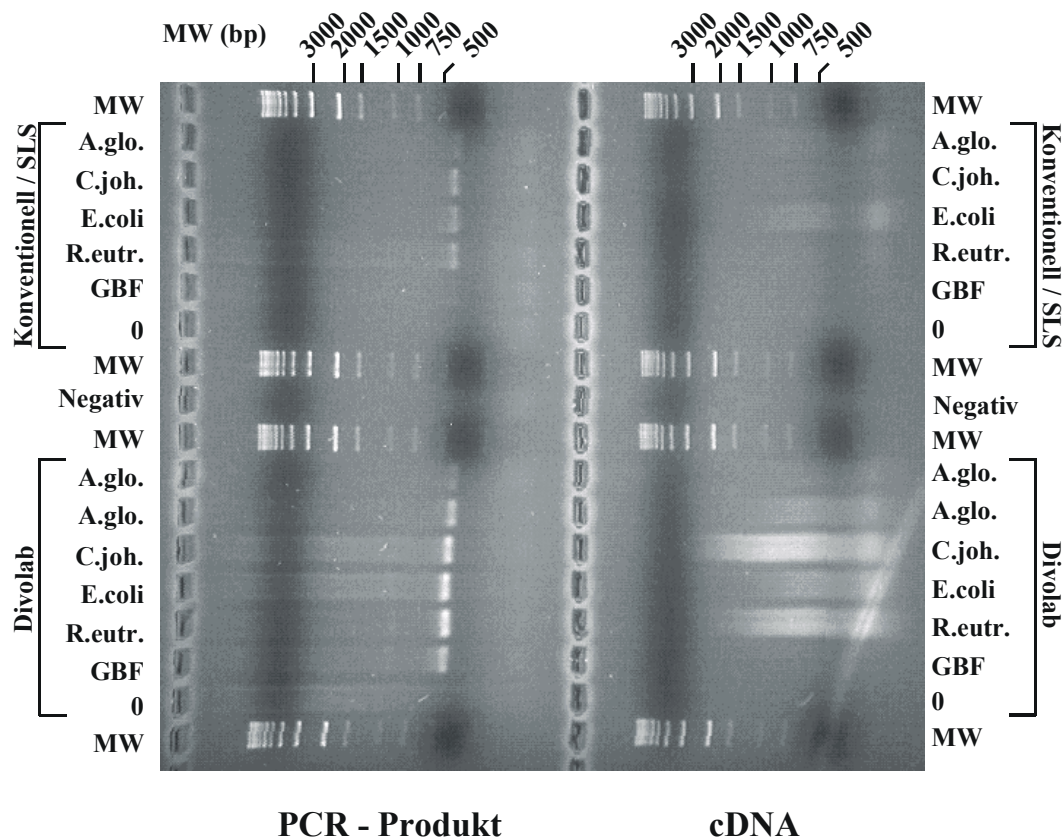


Abbildung 47: Agarose - Gelelektrophorese von cDNA und 16S rDNA - PCR - Produkten aus RNA - Extrakten, extrahiert nach der oben beschriebenen Methode mit den Detergenzien SLS und Divolab. cDNA - Synthese von Gesamt - cDNA erfolgte mit Random - Hexamer - Primern, PCR - Amplifikation aus cDNA erfolgte mit den Primern GC-16-F-985 und 16-R-1385. Für das PCR - Produkt wurde eine Größe von 470 nt erwartet. Negativkontrollen sind Extrakte von Filtern ohne Bakterien. Abk.: A.glo, *Arthrobacter globiformis*, F.joh, *Flavobacterium johnsoniae*; E.coli, *Escherichia coli*; R.eutr, *Ralstonia eutropha*. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Es zeigte sich, daß sich, ausgehend von Gesamt - RNA, Fragmente der 16S rRNA mittels RT - PCR ausgehend von SLS - und von Divolab - Extrakten amplifizieren lassen. Die Ausbeute an PCR - Produkten aus SLS - Extrakten war im Vergleich zu den Divolab Extrakten allerdings geringer. Die Ursache für schwächere PCR - Amplifikationsprodukte liegt, wie in



Abbildung 47 zu erkennen ist, an einer schwächeren reversen Transkription SLS - extrahierter RNA in cDNA.

### **3.2.1.1.5 Validierung der Extraktionsmethode durch Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese**

Aus Nucleinsäureextrakten, nach dem untersuchten Protokoll gewonnen, ließen sich Amplifikationsprodukte von 16S RNA - Fragmenten sowohl aus DNA durch PCR bzw. aus RNA durch RT - PCR gewinnen. Bevor allerdings die neu etablierte Methode zur Analyse mariner bakterieller Lebensgemeinschaften eingesetzt werden konnte, blieben noch einige Fragen zu klären:

- Inwiefern unterscheiden sich die PCR - Produkte (16S RNA - Genpool) von den RT - PCR Produkten (funktionaler 16S RNA - Pool) im Hinblick auf Abundanzen eubakterieller Taxa ?
- Unterscheiden sich die Extraktionseffizienzen der SLS - bzw. der Divolab - Extrakte durch selektive Extraktion bzw. Nicht - Extraktion eubakterieller Taxa ? Das bedeutet: Unterscheiden sich die Bandenmuster zwischen SLS - und Divolab - Extrakten ?
- Hat die Verdünnung von DNA - Extrakten einen Einfluß auf die PCR - Amplifikation und damit das Bandenmuster von DGGE - Gelen ?
- Mit welchem Primerpaar läßt sich eine höhere Biodiversität zeigen, dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907 oder GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 ?

Zur Klärung dieser Fragen wurde auf einem DGGE - Gel folgende Analyse durchgeführt: SLS - und Divolab - DNA - Extrakte der Umweltproben (GBF - Teich) wurden verdünnt, wie in 3.2.1.1.3 beschrieben. Die Verdünnungsstufen waren  $10^0$  (1:1, definiert als 1 µl DNA - Extrakt pro 100 µl PCR - Ansatz, d.h. der in 25 ml Teichwasserprobe enthaltenen DNA - Menge),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  (1:10000). Weiterhin als Ausgangsmaterial verwendet wurden je Ansatz 1 µl 1:1000 verdünnter cDNAs aus Umweltproben (GBF - Teich, Erstellung siehe 3.2.1.1.4). Mit dem Primerpaar 16-F-341 ↔ 16-R-907 und mit dem Primerpaar GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 wurden jeweils folgende Templates amplifiziert: Erstens, die verdünnten Extrakte der SLS - und Divolab - Extrakte; zweitens, jeweils 1:1 Verdünnungen der Negativkontrollen (extrahierte Filter ohne Bakterien) sowie drittens 1:1000 verdünnte cDNAs der Umweltproben nebst Negativkontrollen (cDNAs aus Filterextrakten ohne Bakterien). Die PCR mit dem Primerpaar 16-F-341 ↔ 16-R-907 wurde nach dem Protokoll von (Muyzer *et al.*, 1998) (30 PCR - Zyklen) amplifiziert, PCR mit dem Primerpaar GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 wurde mit dem Protokoll von (Engelen *et al.*, 1998) (35 PCR - Zyklen) durchgeführt. Das DGGE - Gel wurde mit SYBR - Gold gefärbt.

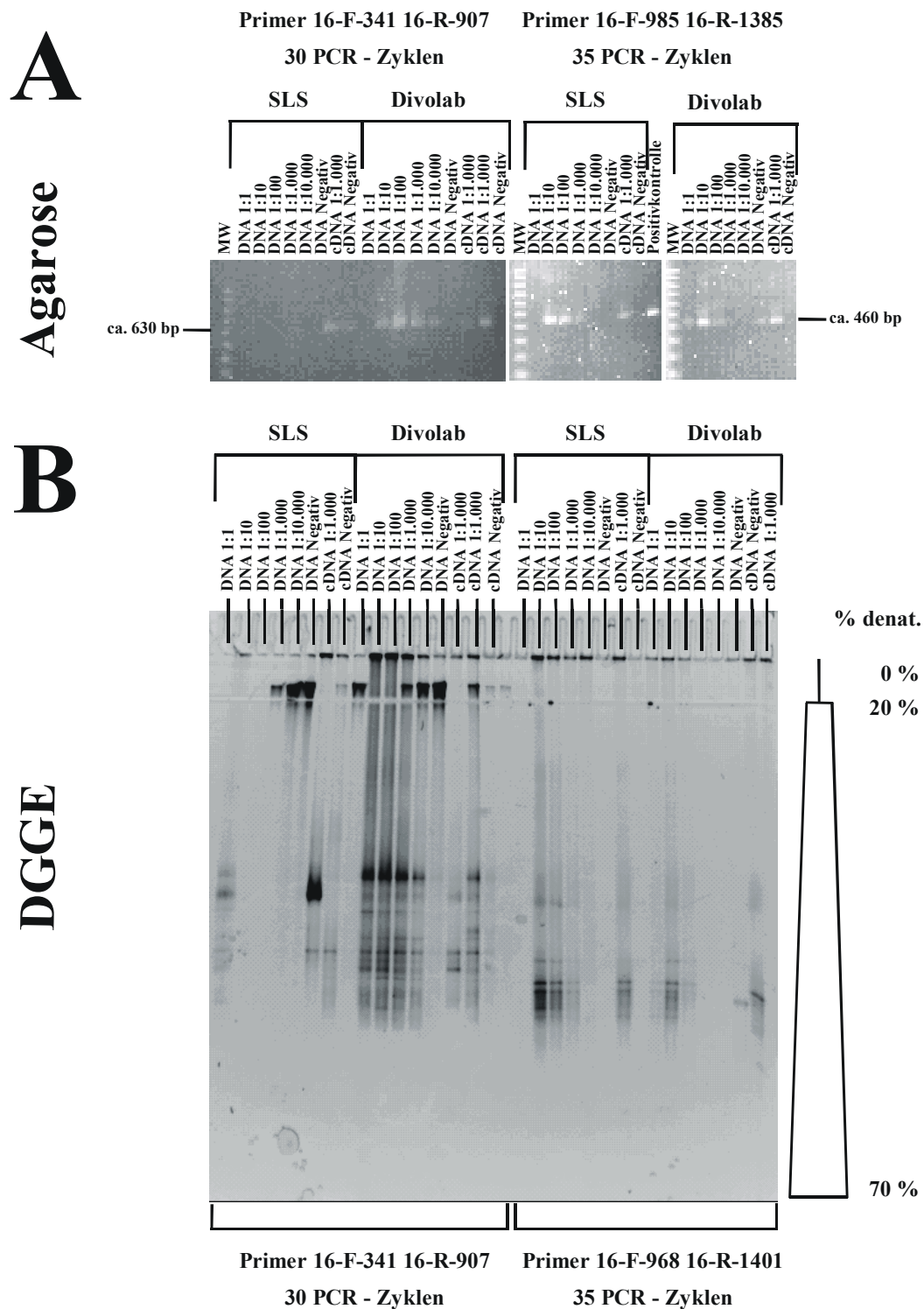


Abbildung 48: Einfluß der Verdünnungsstufen auf die PCR - Amplifizierbarkeit und DGGE - Analyse von PCR - bzw. RT - PCR Produkten aus SLS - bzw. Divolab - Extrakten einer komplexen bakteriellen Lebensgemeinschaft (Wasserprobe GBF - Teich), amplifiziert mit den Primerpaaren 16-F-341 ↔ 16-R-907 bzw. GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385. Abk.: denat., denaturierende Agenzien. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Eine DGGE - Analyse zeigt, daß sich PCR - Produkte von DNA sowohl aus SLS - als auch aus Divolab - Extrakten amplifizieren läßt. Dabei sind die Bandenmuster der jeweiligen PCR - Produkte von Umwelt - DNA, bezogen auf das jeweils verwendete Primerpaar, nahezu identisch - und zwar unabhängig von der eingesetzten Verdünnung. Deutlich wird das am Beispiel der Divolab - Extrakte, amplifiziert mit dem Primerpaar 16-F-341 ↔ 16-R-907. Wie in Abbildung 48 deutlich wird, weisen die PCR - Produkte in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:100 und 1:1000 trotz zehnfach verminderter Template - Konzentration je Verdünnungsstufe, dieselbe Intensität auf. Selbst in der 1:10 000 verdünnten Probe ist das Bandenmuster, trotz geringerer Intensität, immer noch deutlich zu erkennen. Lediglich die 1:1 Stufe zeigt kein Bandenmuster, da kein PCR - Amplifikationsprodukt gebildet wurde. Daraus wird gefolgert, daß der DGGE - Ansatz relativ robust gegenüber der Template - Ausgangskonzentration ist, welche in diesem Versuch um drei Größenordnungen variieren konnte, ohne das Bandenmuster zu beeinflussen.

Eine PCR - Amplifikation von 16S RNA nach reverser Transkription von Gesamt - cDNA war erfolgreich für beide Divolab - extrahierten Umweltproben sowie für die Divolab - extrahierte Probe nach 35 Amplifikationszyklen mit dem Protokoll nach (Engelen *et al.*, 1998). Die erhaltenen Bandenmuster der RT - PCR - Produkte waren sehr ähnlich zu den Bandenmustern, die mit den entsprechenden Primern via PCR aus den DNA - Proben erhalten wurden. Variationen zwischen PCR - und RT - PCR - Produkten waren lediglich hinsichtlich der Intensität einander entsprechender Banden, nicht hinsichtlich dem Vorkommen unterschiedlicher Banden, festzustellen.

Eine PCR - Amplifikation der SLS - DNA - Extrakte mit dem Primerpaar 16-F-341 ↔ 16-R-907 (30 PCR - Zyklen) wurde nicht erreicht, während, vom identischen Probenmaterial ausgehend, mit dem Primerpaar GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 (35 PCR - Zyklen) die Intensität der SLS - Amplifikate diejenige der Divolab - Amplifikate sogar noch übertraf. Die Bandenmuster der SLS - und der Divolab - Extrakte wiesen dieselbe Bandenanzahl und -intensität auf, so daß in Bezug auf die DNA - Extraktion abhängig vom verwendeten Detergenz mittels DGGE - Analyse keine Selektivität nachzuweisen war. Zu klären bliebe, ob durch Erhöhung der Zyklenzahl von 30 auf 35 Zyklen für SLS - Extrakte auch mit dem Primerpaar 16-F-341 ↔ 16-R-907 eine stärkere Amplifikation möglich wäre oder ob das zur DNA - Amplifikation nach (Engelen *et al.*, 1998) verwendete Stoffel - Fragment unempfindlicher gegen inhibierende Substanzen ist als die im Protokoll nach (Muyzer *et al.*, 1998) eingesetzte Taq - Polymerase und dadurch eine stärkere PCR - Amplifikation des Templates bewirkt. Da im weiteren Verlauf dieser Untersuchung die PCR - Amplifikation nach dem Protokoll von (Muyzer *et al.*, 1998) durchgeführt wurde, um durch eine möglichst niedrige Anzahl an Amplifikationszyklen den Einfluß selektiver Amplifikation zu minimieren, wurde diese Fragestellung nicht weiter verfolgt.



Insgesamt bleibt festzuhalten:

- Die Bandenmuster von PCR - Produkten, ausgehend von den 16S RNA - Genen des DNA - Pools einerseits, und RT - PCR - Produkten, den Pool exprimierter 16S rRNA in der Umweltprobe repräsentierend, sind ähnlich (siehe Abbildung 48).
- Die Unterschiede in den Extraktionseffizienzen zwischen der SLS - und der Divolab - Methode sind, DGGE - Analysen zufolge, nicht auf taxonabhängig selektive Extraktion zurückzuführen.
- Die PCR - Amplifikation ist, hinsichtlich des amplifizierten Bandenmusters robust gegenüber der eingesetzten DNA – Menge. Im Test wurden identische DGGE – Bandenmuster erhalten, obwohl die in die PCR eingesetzten DNA – Menge um bis zu drei Größenordnungen variierte.
- Mit dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907 und dem Protokoll nach (Muyzer *et al.*, 1998) ließ sich eine höhere Anzahl an DGGE - Banden und damit eine höhere Biodiversität nachweisen als mit dem Primerpaar GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 und dem Protokoll nach (Engelen *et al.*, 1998).
- Da sich SLS - Extrakte mit dem Protokoll nach (Muyzer *et al.*, 1998) schlechter amplifizieren lassen als Divolab - Extrakte und da das Protokoll nach (Muyzer *et al.*, 1998) sensitiver die Biodiversität im Ansatz erfaßt, als das Protokoll nach (Engelen *et al.*, 1998), erscheint eine Extraktion der Umweltproben mit Divolab als Detergenz für die weitere Untersuchung als Methode der Wahl.

### 3.2.2 Protokoll der DNA – RNA – Extraktion

Somit wurde das in Abbildung 49 dargestellte Protokoll etabliert, nach welchem die Nucleinsäuren aus Meerwasserproben extrahiert wurden.

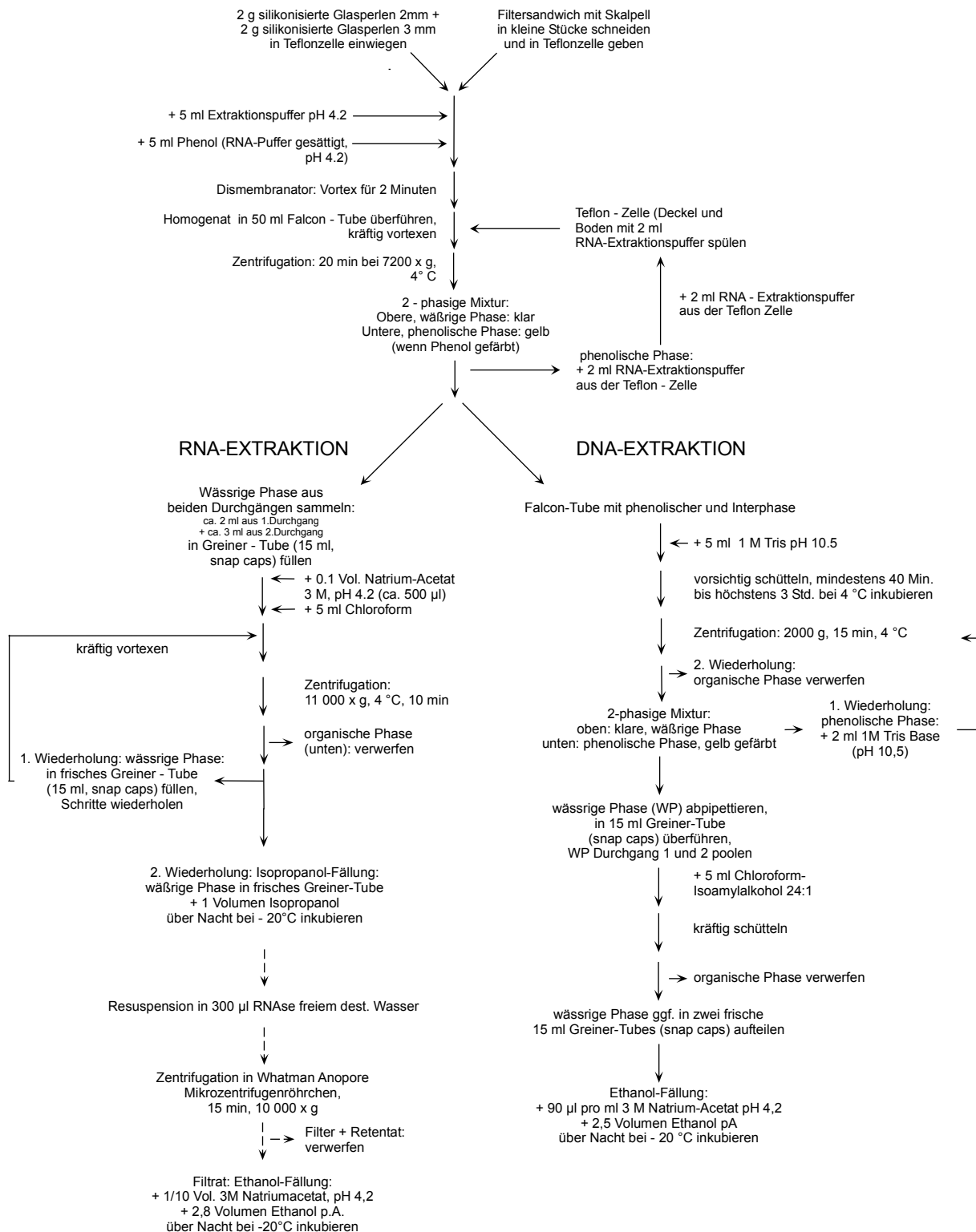


Abbildung 49: Flußschema der optimierten DNA – RNA – Extraktionsmethode. Abkürzung: WP, wässrige Phase.

### 3.2.3 DNA – und RNA – Konzentrationen der Umweltproben

Von den Filtern mit dem Retentat aus jeweils 3 bis 4 Liter Meerwasserprobe wurden Gesamtnucleinsäureextrakte erstellt. Das Probenmaterial wurde am 06.04.1995 von Station S1 aus sechs Tiefenstufen, am 03.04.1995 bzw. 08.04.1995 von Station S2 aus sechs bzw. vier Tiefenstufen entnommen. Gesamtnucleinsäureextrakte wurden mit Hilfe der beschriebenen fraktionierten DNA – RNA - Extraktion erhalten. Extrahiertes Probenmaterial aus der  $> 1 \mu\text{m}$  Fraktion und der  $1 \mu\text{m} > x > 0,2 \mu\text{m}$  – Fraktion wurden getrennt untersucht. Die Bestimmung des DNA – Gehaltes erfolgte mit dem Farbstoff Pico-Green, während der RNA - Gehalt mit Ribo-Green bestimmt wurde (beide Farbstoffe: Molecular Probes Inc., Göttingen). Die Bestimmung erfolgte in Duplikaten bzw. Triplikaten auf 96er Mikrotiterplatten gegen Eichreihen von Lösungen mit bekannten DNA – und RNA – Konzentrationen.

Die Eichgerade für DNA ergab eine lineare Korrelation von Fluoreszenz zu Nucleinsäuremenge zwischen 0,5 und 20 ng im Probenvolumen. Die gemessene Fluoreszenz betrug das 0,44 – fache der DNA – Menge in  $\mu\text{g}$  bei einem Variationskoeffizienten ( $r^2$ ) der Regressionsgerade zu den Meßwerten von 0,996. Für RNA wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Nucleinsäuremenge im Probenansatz für RNA – Mengen zwischen 0,6 und 30 ng je Microwell bestimmt, die gemessene Fluoreszenz betrug das 0,28fache der RNA – Menge in  $\mu\text{g}$  bei einem Variationskoeffizienten  $r^2$  von 0,994. Oberhalb des linearen Bereiches beider Eichgeraden traten Sättigungerscheinungen auf. Eine Erhöhung der eingesetzten Nucleinsäuremengen bewirkte nur noch unproportional niedrige bzw. keine Steigerung der gemessenen Fluoreszenz.

Die Nucleinsäureextrakte aus Meerwasserproben wurden auf derselben Mikrotiterplatte wie die Proben der Eichreihe vermessen. Eingesetzt wurden für die Bestimmung der DNA – und RNA – Konzentrationen die Menge an Nucleinsäuren, die aus 135, 240 und 360 ml Meerwasserproben extrahiert wurden. Wegen höherer zu erwartender Nucleinsäurekonzentrationen im oberflächennahen Wasser wurden für die Proben aus 5 m Tiefe äquivalente Mengen zu lediglich 30, 55 und 80 ml Meerwasserprobe eingesetzt. Die gemessenen Fluoreszenzwerte nahezu aller Nucleinsäuremengen aus den zu vermessenden Umweltnucleinsäureextrakten befanden sich innerhalb der jeweiligen linearen Bereiche der Eichgeraden. Nicht innerhalb der Eichgerade liegende Fluoreszenzmeßwerte wurden bei der Konzentrationsbestimmung nicht berücksichtigt. Die gemessenen DNA – und RNA – Konzentrationen, bezogen auf die in einem Liter Wasserprobe sowie pro Zelle vorhandene Nucleinsäuremenge finden sich in Tabelle 21.

Proben	Tiefe [m]	DNA [ $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ]	RNA [ $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ]	Gesamt- Zellzahl $\times 10^8 \text{ L}^{-1}$	DNA / Zelle [fg]	RNA / Zelle [fg]	RNA / DNA Verhältnis
08.04.1995 S2 partikel- gebunden	5	67,9 $\pm$ 3	304,4 $\pm$ 15,2	7,51	21,6 $\pm$ 1,7	147,3 $\pm$ 15,3	4,5 $\pm$ 0,2
	100	22,7 $\pm$ 16,6	14,7 $\pm$ 34,8	2,21	27,4 $\pm$ 8,9	51,3 $\pm$ 24,5	0,7 $\pm$ 2
	250	5,2 $\pm$ 6,4	52,3 $\pm$ 0,9	3,57	4,4 $\pm$ 4,9	27,9 $\pm$ 0,9	10 $\pm$ 0,2
	400	19,1 $\pm$ 7,6	36,9 $\pm$ 10,4	2,24	9,1 $\pm$ 4,8	28,0 $\pm$ 5,2	1,9 $\pm$ 1
08.04.1995 S2 frei- lebend	5	94,2 $\pm$ 9,8	802,2 $\pm$ 99,6	7,51	21,6 $\pm$ 1,7	147,3 $\pm$ 15,3	8,5 $\pm$ 0,1
	100	37,8 $\pm$ 3,1	98,7 $\pm$ 19,3	2,21	27,4 $\pm$ 8,9	51,3 $\pm$ 24,5	2,6 $\pm$ 0,5
	250	10,6 $\pm$ 11,2	47,4 $\pm$ 2,4	3,57	4,4 $\pm$ 4,9	27,9 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 0,5
	400	1,4 $\pm$ 3,2	25,8 $\pm$ 1,2	2,24	9,1 $\pm$ 4,8	28,0 $\pm$ 5,2	18,4 $\pm$ 0,2
03.04.1995 S2 partikel- gebunden	5	57,7 $\pm$ 4,1	812,3 $\pm$ 55,7	nd	-	-	14,1 $\pm$ 0,1
	80	4,4 $\pm$ 0,3	41,6 $\pm$ 0,9	nd	-	-	9,5 $\pm$ 0,1
	110	3,8 $\pm$ 2,5	47,4 $\pm$ 3,8	nd	-	-	12,6 $\pm$ 0,1
	150	2,3 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,8	nd	-	-	2,8 $\pm$ 0,5
	260	1,4 $\pm$ 0,7	37,9 $\pm$ 0,2	nd	-	-	26,7 $\pm$ 0,1
	400	2,4 $\pm$ 0,6	35,3 $\pm$ 14,6	nd	-	-	15 $\pm$ 0,1
03.04.1995 S2 frei- lebend	5	60,8 $\pm$ 5,2	80,7 $\pm$ 22,3	nd	-	-	1,3 $\pm$ 1,1
	80	3,5 $\pm$ 0,9	11,8 $\pm$ 0,9	nd	-	-	3,4 $\pm$ 0,4
	110	5,1 $\pm$ 1,8	12,7 $\pm$ 1,2	nd	-	-	2,5 $\pm$ 0,6
	150	2,7 $\pm$ 0,6	10,5 $\pm$ 2,9	nd	-	-	3,9 $\pm$ 0,4
	260	2,1 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 2,9	nd	-	-	1,6 $\pm$ 5
	400	2,9 $\pm$ 0,7	12,9 $\pm$ 0,3	nd	-	-	4,4 $\pm$ 0,3
06.04.1995 S1 partikel- gebunden	5	27,7 $\pm$ 8,3	248,1 $\pm$ 11,4	3,354	30,1 $\pm$ 8,2	93,1 $\pm$ 6,0	9 $\pm$ 0,2
	90	4,1 $\pm$ 0,1	39,2 $\pm$ 12,2	2,904	13,8 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 9,2	9,5 $\pm$ 0,2
	130	7,1 $\pm$ 0,3	18,2 $\pm$ 5,8	3,806	12,9 $\pm$ 7,4	13,9 $\pm$ 2,7	2,6 $\pm$ 0,6
	280	7,1 $\pm$ 1,4	16,4 $\pm$ 3,1	2,995	9,5 $\pm$ 4,5	7,9 $\pm$ 1,4	2,3 $\pm$ 0,6
	400	2,6 $\pm$ 1	12,2 $\pm$ 0,3	0,924	8,3 $\pm$ 4,9	13,9 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,3
	600	2,2 $\pm$ 0,6	8,2 $\pm$ 0,4	nd	-	-	3,7 $\pm$ 0,4
06.04.1995 S1 frei- lebend	5	73,3 $\pm$ 19,1	64 $\pm$ 8,9	3,354	30,1 $\pm$ 8,2	93,1 $\pm$ 6,0	0,9 $\pm$ 1,7
	90	35,9 $\pm$ 2,9	28,2 $\pm$ 14,6	2,904	13,8 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 9,2	0,8 $\pm$ 2,8
	130	42 $\pm$ 27,7	34,8 $\pm$ 4,3	3,806	12,9 $\pm$ 7,4	13,9 $\pm$ 2,7	0,8 $\pm$ 2,3
	280	21,4 $\pm$ 12	7,2 $\pm$ 1	2,995	9,5 $\pm$ 4,5	7,9 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 5,3
	400	5,2 $\pm$ 3,6	0,6 $\pm$ 0,3	0,924	8,3 $\pm$ 4,9	13,9 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 28,1
	600	4,1 $\pm$ 3,3	2,7 $\pm$ 0,6	nd	-	-	0,7 $\pm$ 3,5

Tabelle 21: DNA – und RNA – Konzentrationen pro Liter Meerwasserprobe und pro Zelle. Abkürzung: n.d., Zellzahlen wurden nicht bestimmt. Zellzahlen wurden nur in unbehandelten nicht in fraktionierten Meerwasserproben bestimmt. Deshalb sind die Zellzahlen als Gesamtzellzahlen angegeben und enthalten identische Angaben für freilebende und partikelgebundene Fraktionen. DNA - und RNA – Gehalt pro Zelle wurden berechnet, indem die Summe der DNA – und RNA – Gehalte der freilebenden und partikelgebundenen Fraktion addiert und durch die Gesamtzellzahl (GZZ) dividiert wurden, da lediglich GZZ – Zahlen für unfraktioniertes Meerwasser erhoben wurden.

Die Konzentration extrahierbarer DNA variierte zwischen  $94,2 \pm 9,8 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $1,4 \pm 3,2 \mu\text{g L}^{-1}$  bei einem Mittelwert von  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , die Konzentration extrahierbarer RNA betrug zwischen  $812,3 \pm 55,7 \mu\text{g L}^{-1}$  und  $0,59 \pm 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  bei einem Mittelwert von  $93,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Das Verhältnis von RNA zu DNA betrug zwischen 26,7 und 0,1. An Station S1 wurde für die am 06.04.1995 gezogenen Proben ermittelt, daß das RNA / DNA Verhältnis des Retentates der  $> 1 \mu\text{m}$  Fraktion generell größer als 1, das der Fraktion  $1 \mu\text{m} > x > 0,2 \mu\text{m}$  immer kleiner als 1 war. Bei allen Probennahmetagen war im Schnitt das RNA / DNA – Verhältnis der partikelgebundenen Fraktionen immer höher als das der freilebenden Fraktionen. Gemittelt auf alle Proben betrug der Mittelwert des RNA / DNA Verhältnisses für die partikelgebundenen Fraktionen (P)  $13,4 \pm 3,5$ , für die freilebenden Fraktionen (F)  $3,9 \pm 2,1$ . Für Station S1 am 06.04.1995 sind die betreffenden Mittelwerte  $5,3 \pm 7,7$  (P) und  $0,6 \pm 1,8$  (F); für Station S2 betrugen die Werte am 03.04.1995  $13,5 \pm 25,1$  (P) und  $2,9 \pm 4,6$  (F) sowie am 08.04.1995  $4,3 \pm 7,0$  (P) und  $8,5 \pm 12,0$  (F). Die höchsten DNA – und RNA – Konzentrationen wurden im oberflächennahen Wasser gefunden. Dort betrug das Verhältnis der RNA – bzw. DNA - Konzentrationen der jeweiligen Fraktion bezogen auf den jeweils zweithöchsten innerhalb eines Tiefenprofils gemessenen Wert für RNA das 6 – 17 - fache ( $> 1 \mu\text{m}$ ) bzw. das 2 – 8 fache ( $1 \mu\text{m} > x > 0,2 \mu\text{m}$ ), für DNA das 3 – 13 fache ( $> 1 \mu\text{m}$ ) bzw. das 2 – 17 fache. Eine grafische Darstellung der Nucleinsäurekonzentrationen, bezogen auf 1 Liter Meerwasserprobe findet sich in Abbildung 50, bezogen auf die Nucleinsäuremenge je Zelle in Abbildung 51.

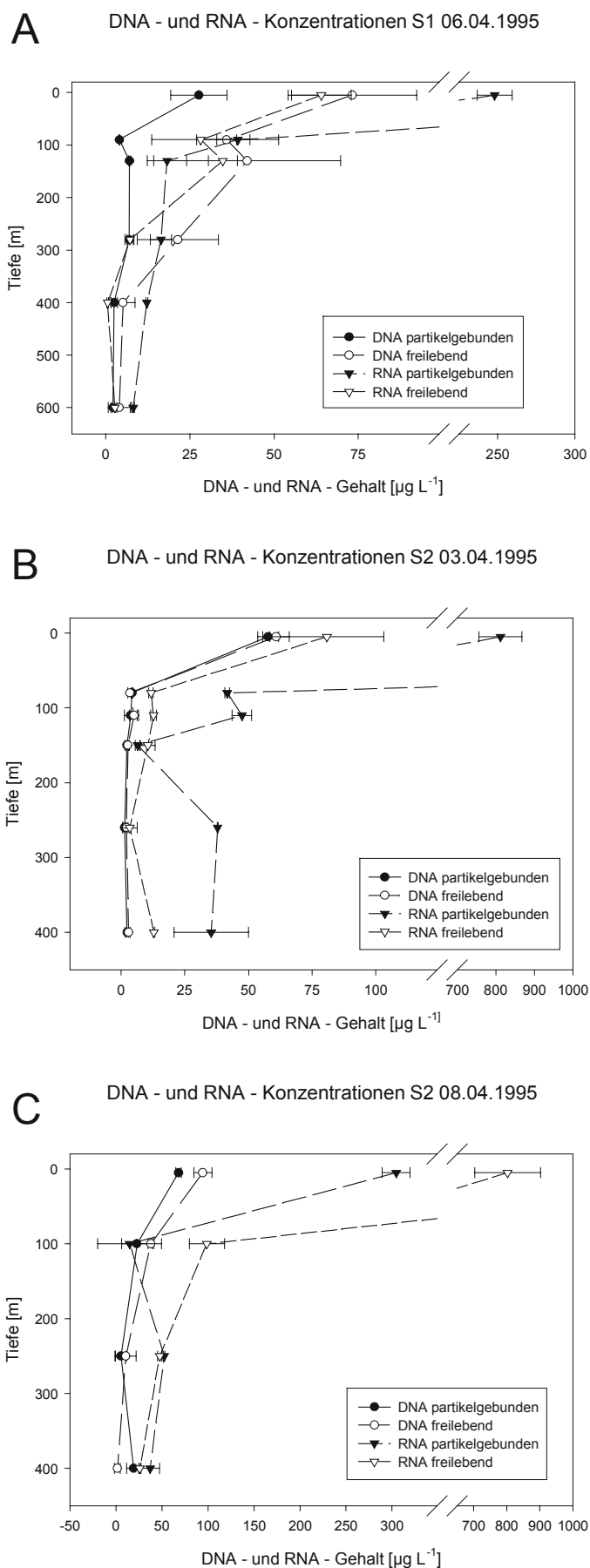


Abbildung 50 A, B und C: DNA – und RNA – Gehalt pro Liter Meerwasserprobe an den Stationen S1 und S2

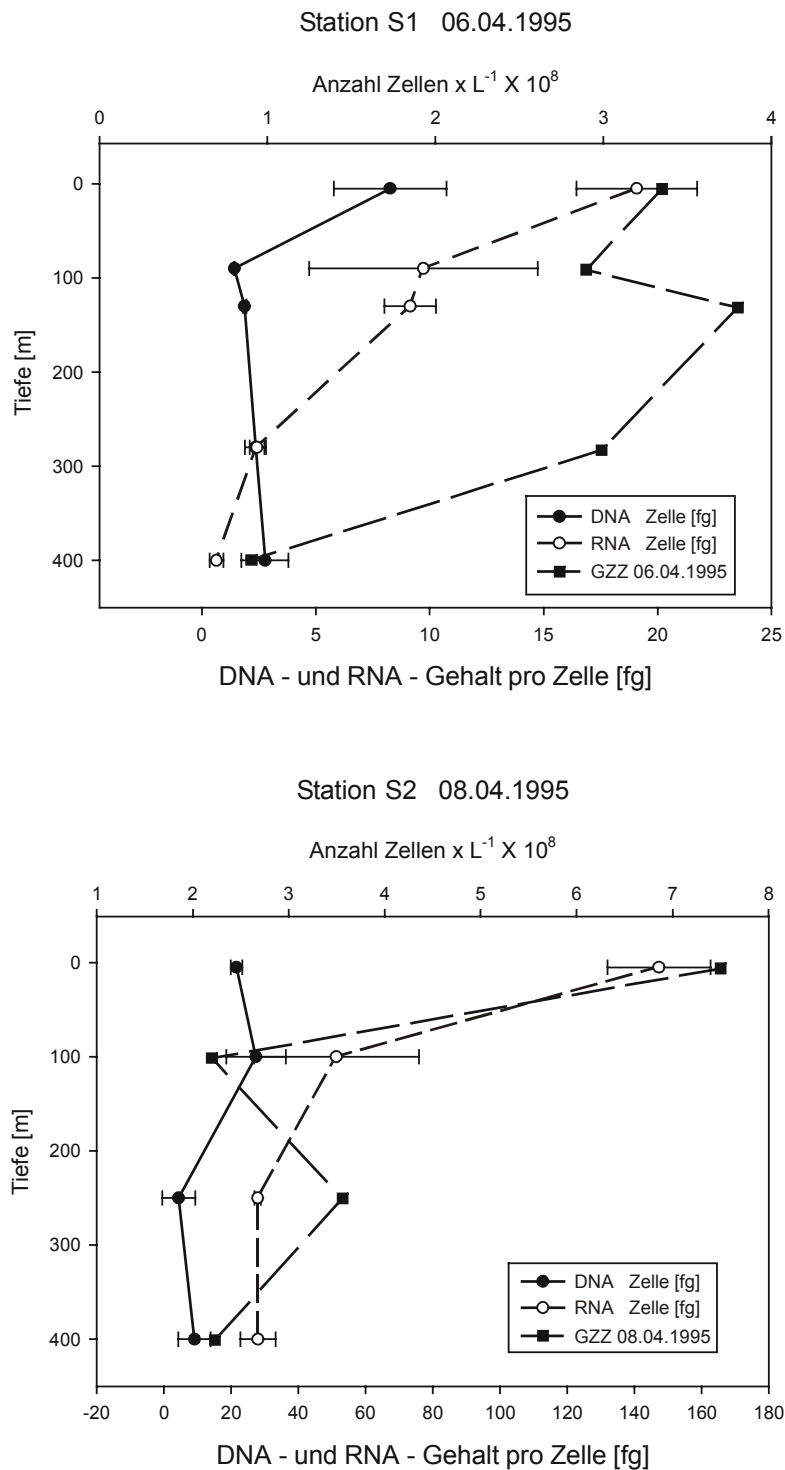


Abbildung 51: Mittlerer DNA – und RNA – Gehalt pro Zelle sowie zum Vergleich Gesamtzellzahlen (GZZ) an den Stationen S1 und S2

### **3.2.4 Kultivierungsunabhängige Charakterisierung mariner bakterieller Lebensgemeinschaften**

Mit Hilfe der entwickelten Methode zur fraktionierten Isolierung bakterieller DNA und RNA war es nun möglich, DNA und RNA aus derselben Umweltprobe zu trennen. Somit konnten marine bakterielle Lebensgemeinschaften kultivierungsunabhängig mittels DNA – und RNA – basierten Analysen charakterisiert werden.

### **3.2.5 Analyse der niedermolekularen RNA Profile**

Eine Analyse der Wasserproben anhand ihrer LMW-RNA Profile sollte einen Einblick in quantitative Veränderungen der Zusammensetzung von mikrobiellen Lebensgemeinschaften ermöglichen. Im Unterschied zu PCR - basierten Methoden findet bei der direkten Analyse niedermolekularer RNAs keine Beeinflussung des Meßergebnisses durch PCR - typische Artefakte wie Primerselektivität, präferentielle Amplifikation von Templates oder Chimärenbildungen statt. Kritische Parameter sind lediglich Selektivitäten durch nicht quantitativen Zellaufschluß (bedingt durch unterschiedliche Refraktivität der Zellen) sowie die Effizienz des radioaktiven Labelings der Zielmoleküle aufgrund von Unterschieden in deren Sekundärstruktur. Im Unterschied zu PCR - basierten Methoden ist somit eine Quantifizierung anhand von Vergleichen der ODs der einzelnen Banden möglich. Da, wie bereits erwähnt, die Klasse II - und Klasse I - tRNAs bei unterschiedlichen Gattungen ähnliche Größen aufweisen, überlagern sich bei den Analysen im Bereich zwischen 100 und 70 nt komplexe Mischungen aus tRNA – Bandenmustern verschiedener Organismengruppen. Einzelne tRNA – Banden dieser komplexen Muster lassen sich nicht eindeutig definierten OTUs zurechnen. 5S rRNA – Bandenmuster sind von der Problematik der Überlagerung zwar ebenfalls betroffen, jedoch in geringerem Maße, da abundante, unterhalb der Spezies – Ebene miteinander verwandte Organismen in der Regel nur eine einzige 5S rRNA – Bande aufweisen. Aus diesem Grund erscheint nur ein Vergleich der 5S rRNA Bandenmuster sinnvoll (Höfle, 1992). Allerdings gilt zu bedenken, daß die 5S rRNAs aller bekannter prokaryotisch organisierten Organismen Größen zwischen maximal ca. 130 und minimal ca. 110 nt besitzen, die meisten sogar im Bereich zwischen 122 und 112 nt, so daß die Abundanz einer einzelnen Bande nicht die Abundanz einer einzelnen Spezies oder einer einzelnen OTU bedeuten muß.



## Station S2 08.04.1995

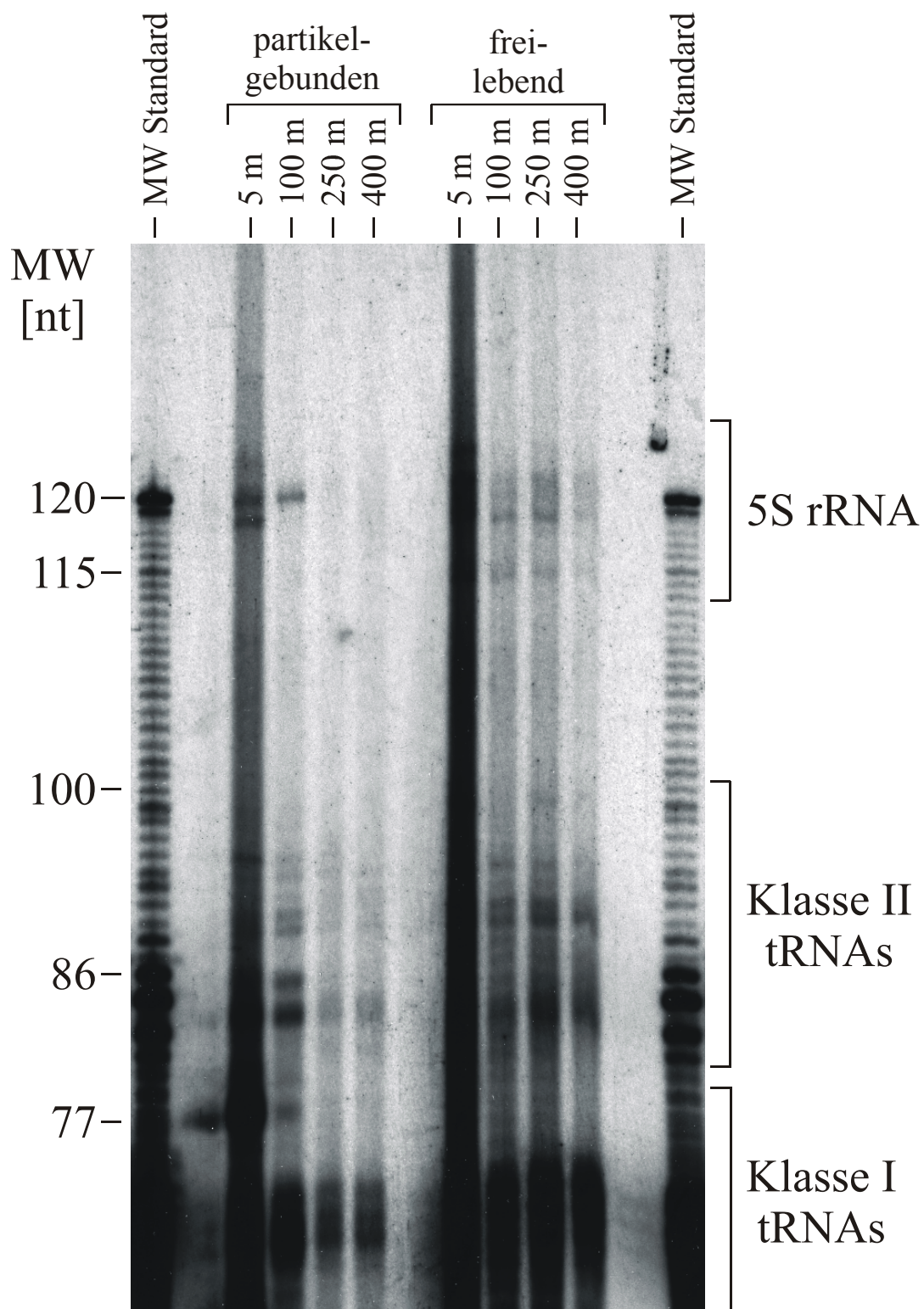


Abbildung 52: Niedermolekulare RNA – Profile partikelgebundener und freilebender bakterieller Lebensgemeinschaften an Station S2 am 08.04.1995. Die Expositionsdauer des Röntgenfilmes betrug 59 Tage, daher sind einige Gelspuren überexponiert. Densitometrische Kurven der Region zwischen 130 nt und 110 nt sind in Abbildung 53 dargestellt. Abkürzungen: MW, Molekulargewicht; nt, Nucleotide.

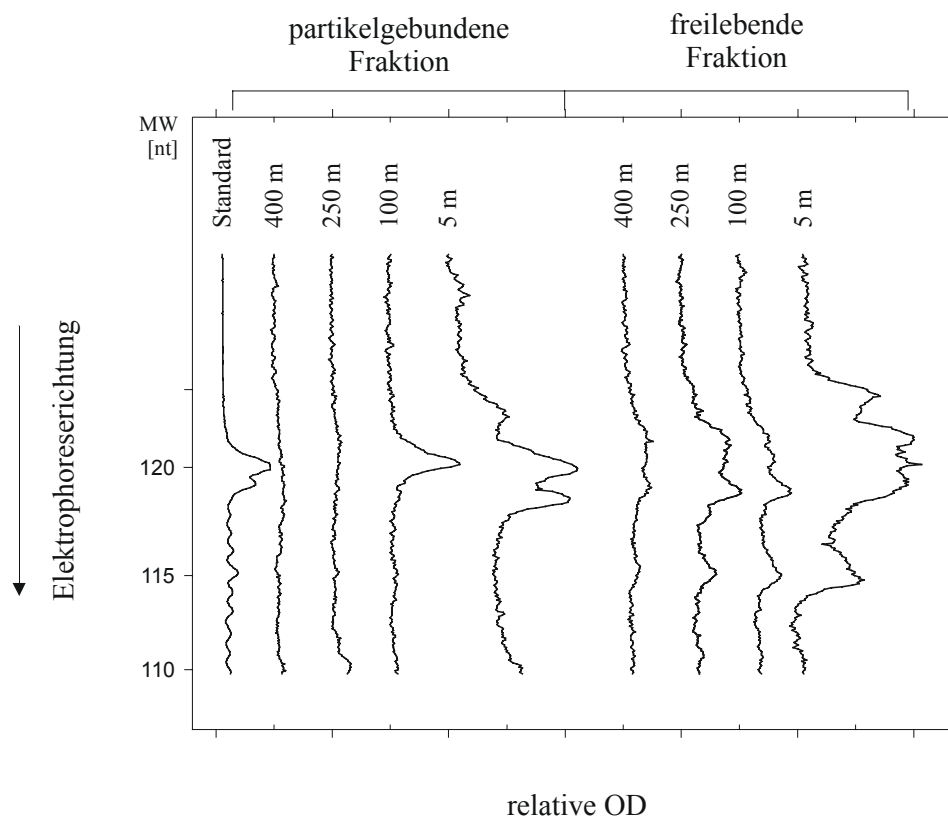


Abbildung 53: Densitometrische Kurven der in Abbildung 52 dargestellten 5S rRNA – Profile. Die densitometrischen Kurven stellen den Bereich zwischen den Nucleotidpositionen 130 und 110 dar.

Insgesamt ergab sich bei diesen Analysen ein übersichtliches Bild. Lediglich eine bis sechs verschiedene 5S rRNA Banden wurden in den Wasserproben aus unterschiedlichen Tiefen nachgewiesen.

Die oberflächennahen Wasserproben aus 5 m Wassertiefe wiesen sowohl in der partikelgebundenen als auch in der freilebenden Fraktion die höchste Anzahl an Banden auf. In der partikelgebundenen Fraktion waren in der Probe aus 5 m Wassertiefe sechs Banden im Bereich der 5S rRNA Banden nachzuweisen. Etwa 90 % der Summe der optischen Dichten aller 5S rRNA – Banden entfielen dabei auf lediglich zwei Banden bei 120 und 118 nt. Für die restlichen Wasserproben der partikelgebundenen Fraktion fiel das Ergebnis übersichtlicher aus: Nur jeweils zwei bis drei Banden in der Region um 120 nt, 116 nt und 110 nt konnten hier nachgewiesen werden. Allerdings waren die aufgetragenen RNA Mengen zu niedrig, um weitere, schwächere Banden detektieren zu können. Analog wurde in der freilebenden Fraktion in 5 m Wassertiefe mit acht Banden die höchste Diversität nachgewiesen. Der prozentuale Anteil einzelner Banden an der Gesamt - OD aller 5S rRNA Banden verteilte sich in der freilebenden Fraktion gleichmäßiger als in der partikelgebundenen Fraktion: Keine Bande konnte hier einen prozentualen Anteil von deutlich mehr als 20 % auf sich vereinigen. Auch aus 100 m Tiefe wurden sieben Banden erhalten. Das 5S rRNA Bandenmuster der freilebenden bakteriellen Lebensgemeinschaft aus 250 m und 400 m Tiefe war in der Diversität deutlich reduziert und wurde durch lediglich jeweils vier Banden repräsentiert. Die Ergebnisse der 5S rRNA – Analyse wurden in Tabelle 22 zusammengefaßt.

	partikelgebundene Fraktion						freielebende Fraktion					
	5		100		250		400		5		100	
	IntOD	% IntOD	IntOD	% IntOD	IntOD	% IntOD	IntOD	% IntOD	IntOD	% IntOD	IntOD	% IntOD
129	0,23	1,9										
128	0,308	2,5										
124									2,727	12,7		
123	0,394	3,3										
122	0,294	2,4										
121					0,111	38,6			3,02	14	0,302	7,9
120	6,756	55,3	4,264	90,3	0,052	17,9			4,943	22,9	0,267	7
119							0,626	57,9	3,314	15,4	1,118	31,1
118	4,23	34,6										
116							0,149	13,8	2,404	11,2	0,604	15,8
115					0,125	43,5			2,435	11,3	1,131	29,6
114												
113												
111												
110							0,306	28,3				
109			0,46	9,7							0,23	5,8
108									1,365	6,3		
107									1,341	6,2	0,159	4,3
106											0,162	4,3

Tabelle 22: Optische Dichte (IntOD) und prozentualer Anteil der optischen Dichte an der Gesamt - OD der 5S rRNA Banden je Spur (%IntOD) für die Analyse von 5S rRNAs aus Umweltproben vom 08.04.1995 (Station S2).

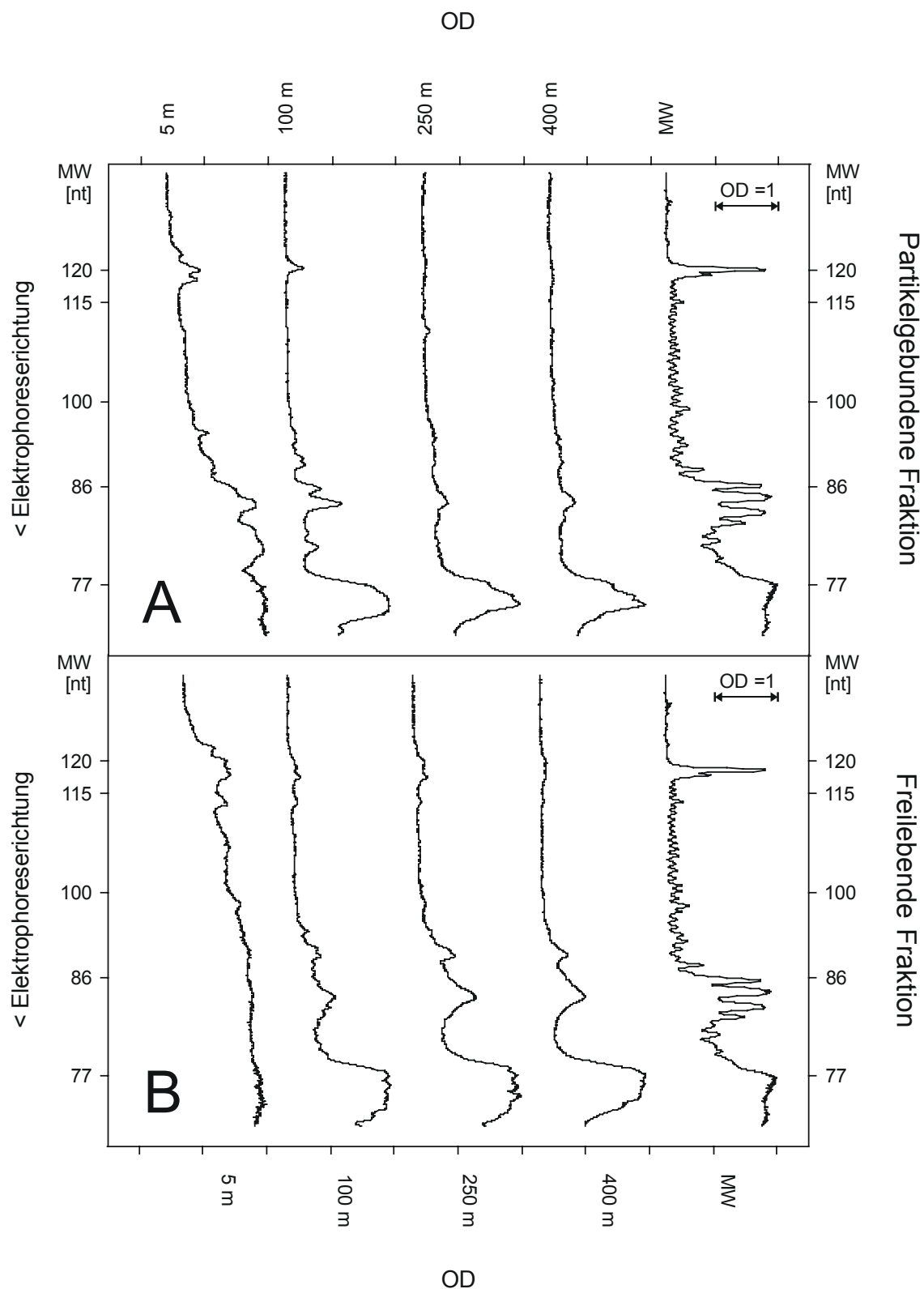


Abbildung 54: Densitometrische Kurven der in Abbildung 52 dargestellten 5S rRNA – Profile. Die densitometrischen Kurven stellen den Bereich zwischen den Nucleotidpositionen ca. 130 und ca. 70 dar. A: Partikelgebundene Fraktion, B: freilebende Fraktion. Abkürzungen: OD, optische Dichte; MW, Molekulargewicht, gemessen als Nucleotidanzahl der betreffenden Moleküle.

Insgesamt war bei den Wasserproben aus 100 m, 250 m und 400 m Tiefe auch nur eine geringe Anzahl abundanter tRNAs nachzuweisen: In der partikelgebundenen Fraktion bei 94, 93, 90, 89, 85, 84 und 83 nt, in der freilebenden Fraktion bei 93, 91, 90, 88 und 83 nt (lediglich in der Probe aus 100 m Wassertiefe der freilebenden Fraktion wurde noch eine Klasse II tRNA- Bande bei 98 nt gefunden). Zusammenfassend mit den Ergebnissen der 5S rRNA – Analyse wurde die Folgerung gezogen, daß zum Zeitpunkt der Probennahme offensichtlich nur eine geringe Anzahl an Taxa eine hohe physiologische Aktivität *in situ* besaß. Gelscans über den gesamten Bereich niedermolekularer RNA zwischen einer Nucleotidanzahl zwischen ca. 130 und ca. 70 nt sind in Abbildung 54 dargestellt.

Die Banden traten auf dem Autoradiogramm teilweise nur nach dreitägiger bis mehrwöchiger Exposition zutage. Das ist ein Indiz, daß die Menge in die Reaktion eingesetzter RNA limitierend war. Allerdings wurde in die Analysen die gesamte, aus 2 Liter Meerwasser extrahierbare RNA - Menge eingesetzt. Da lediglich drei bis vier Liter Wasserproben abfiltriert worden waren, konnte die eingesetzte RNA - Menge leider nicht erhöht werden.

### **3.2.6 Analyse der Struktur mariner bakterieller Lebensgemeinschaften durch Denaturierende Gradienten-Elektrophorese (DGGE)**

#### **3.2.6.1 Analytische DGGE-Gele**

Bevor mit der Analyse von Umwelt - Nucleinsäureextrakten mittels DGGE begonnen wurde, galt es, optimale Parameter für die Elektrophoreseläufe zu bestimmen. Diese Parameter umfassten:

- Bestimmung der optimalen Primer
- Bestimmung des optimalen Gradienten
- Bestimmung der optimalen Laufzeit
- Analyse der DGGE - Bandenmuster von Isolaten

#### **3.2.6.2 Bestimmung des optimalen Primerpaares**

Zunächst wurde das optimale Primerpaar bestimmt, das zur Amplifikation partieller 16S rRNA Genfragmente eingesetzt werden sollte. Drei Primerpaare standen zur Auswahl:

- GC-16-F-357 ↔ 16-R-907 (Muyzer *et al.*, 1998)
- GC-16-F-357 ↔ 16-R-518 (Muyzer *et al.*, 1998)
- GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 (Engelen *et al.*, 1998)

Um das geeignetste Primerpaar zu ermitteln, wurden PCR – Amplifikationen durchgeführt und mittels Agarose – und DGGE – (PAA) – Elektrophorese analysiert. Als Ausgangsmaterial dienten die DNA – und RNA – Extrakte, die während der Optimierung der DNA - / RNA –

Extraktion gewonnen wurden. Die Resultate der DGGE – Analyse ausgehend von PCR – Produkten aus einer Umweltprobe (GBF – Teich) wurden in Abbildung 48 dargestellt. Wie in Abbildung 48 erkennbar, haben die Primerpaare spezifische Vor – und Nachteile:

- **GC-16-F-341 ↔ 16-R-907** (Muyzer *et al.*, 1998) amplifiziert ein ca. 600 nt langes Fragment des 16S rRNA Gens. Im amplifizierten Fragment befinden sich die variablen Regionen V3, V4 und V5. Die Amplifikation eines langen Fragmentes des 16S rRNA Genes ermöglicht nach Ausschneiden und Sequenzierung der Bande den Vergleich der Sequenzen anhand eines 1/3 des gesamten 16s rRNA Fragmentes. Das Verhältnis relativ hypervariabler Positionen zur Gesamtzahl an Nucleotiden des Genfragmentes ist niedriger als bei dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-518, resultierend in möglicherweise schlechterer Auftrennung
- **GC-16-F-341 ↔ 16-R-518** (Muyzer *et al.*, 1998) amplifiziert ein ca. 180 nt langes Fragment, in dem die variable Region V3 eingeschlossen ist. Vorteile dieses Primerpaares sind (1) der Primer 16-R-518 ist komplementär zu einer der am stärksten konservierten Regionen des 16S rRNA Gens und gewährleistet somit die Amplifikation eines breiten Organismenspektrums, sowie (2) eine hohe Auflösung, da der Anteil der variablen Nucleotidpositionen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Positionen des Genfragmentes hoch ist, allerdings um den Preis, daß Polymorphismen der verschiedenen 16S rRNA - Gene einzelner Organismen zur Bildung mehrerer DGGE - Banden führen, die alle nur einen einzigen Organismus repräsentieren und damit eine zu hohe Biodiversität vortäuschen können.
- **GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385** (Engelen *et al.*, 1998) amplifiziert ein ca. 450 nt langes Stück aus der 3' – Region des 16S rRNA. Fragmentes und enthält die hypervariabler Region V6 sowie die variablen Regionen V7 und V8.

Gegen die Verwendung des Primerpaares GC-16-F-341 ↔ 16-R-518 sprachen folgende Gründe: Eine PCR – Amplifikation mit Umwelt – DNA zeigte, daß die Amplifikation mit dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907 zuverlässiger klappte als mit dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-518. Die relativ kurzen Amplifikationsprodukte, die mit letztgenanntem Primerpaar erhalten wurden, erwiesen sich außerdem als extrem anfällig gegen Degradation, die schon nach kurzer Lagerung über Nacht Effekte zeigte. Deswegen wurde das Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907 gegenüber dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-518 bevorzugt.

Eine PCR - Amplifikation von 16S rRNA Genfragmenten aus Umwelt – DNA mit dem Primerpaar GC-16-F-985 ↔ 16-R-1385 erwies sich als ebenso zuverlässig wie die Amplifikation mit dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907, nach Vergleich der erhaltenen Amplifikationsprodukte auf einem DGGE – Gel zeigte sich jedoch, daß sich die Banden über einen weiteren Bereich des Gradienten aufspreizten und eine höhere Bandenzahl aufwiesen (Abbildung 48) Deswegen wurde für die weiteren Untersuchungen das Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907 ausgewählt.

### 3.2.6.3 Bestimmung des optimalen Gradienten

Der Gradient für eine optimale Auftrennung wurde ermittelt, indem ein Gemisch amplifizierter 16S rRNA Genfragmente von mediterranen Isolaten und Umwelt – DNA Extrakten der beprobten Stationen auf ein rechtwinkliges („perpendicular“) DGGE – Gel aufgetragen wurde. Bei diesem Gel befindet sich der denaturierende Gradient im rechten Winkel zum elektrischen Feld. Das hat zur Folge, daß DNA – Fragmente im nicht denaturierenden Teil schnell durch das Gel wandern, während im denaturierenden Bereich des Geles die DNA – Fragmente unmittelbar nach dem Einwandern in die Gelmatrix denaturiert werden, partiell aufschmelzen und deren Mobilität erheblich herabgesetzt wird. Der Bereich des Schmelzpunktes der DNA ist durch zunehmenden Mobilitätsverlust der Fragmente gekennzeichnet, optisch wahrnehmbar durch einen sigmoiden Verlauf der DNA – Bande vom mobilen nicht denaturierenden Bereich zum immobilen nicht denaturierenden Bereich hin. Der Bereich des Gradienten zwischen der bei der niedrigsten und der höchsten Konzentration denaturierender Agenzien aufschmelzenden Banden ist der optimale Auflösungsbereich. Dieser Bereich des denaturierenden Gradienten muß bei der Durchführung einer horizontalen DGGE gewählt werden, um eine optimale Auflösung zu erreichen.

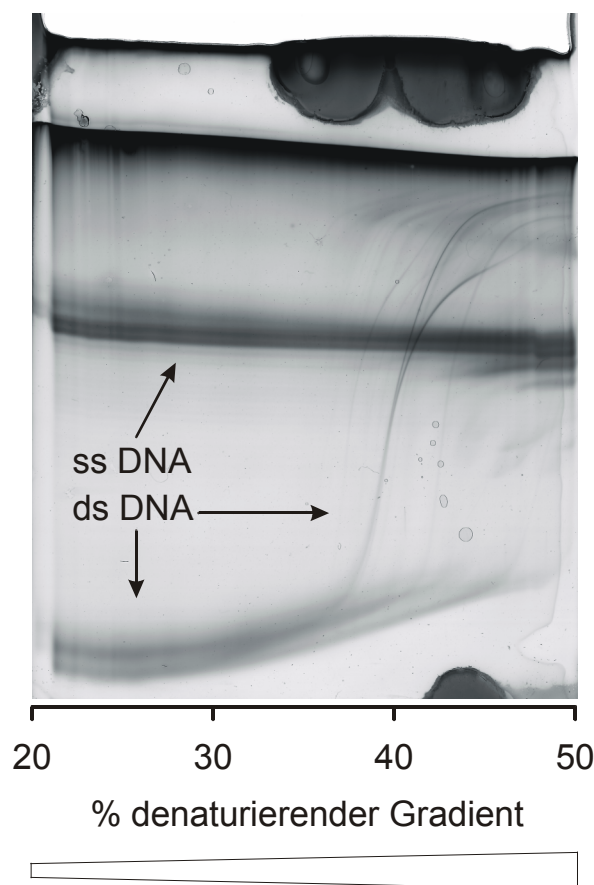


Abbildung 55: Bestimmung des Schmelzpunktes der partiellen 16S rRNA - Genfragmente im DGGE - Gradienten.

Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, liegt die optimale Auflösung für das Probenmaterial im denaturierenden Gradienten zwischen einer Konzentration von 30 % und 50 % denaturierender Agenzien (Eine Konzentration von 100 % denaturierender Agenzien entspricht 40 ml Formamid und 42 g Harnstoff pro 100 ml Gellösung).

#### **3.2.6.4 Bestimmung der optimalen Laufzeit**

Da die Nucleinsäurefragmente im denaturierenden Gradienten nicht nach Fragmentlänge sondern nach dem Schmelzverhalten getrennt werden, war es erforderlich, den Zeitpunkt zu bestimmen, nachdem eine optimale Auftrennung der Fragmente erfolgt war. Zu diesem Zweck wurde auf einem Gradientengel von 20 % bis 50 % denat. alle 15 min eine Probe aufgetragen. Eine optimale Auftrennung erfolgte nach frühestens zwei Stunden, die partiell geschmolzenen Fragmente wanderten zwar nach partieller Denaturierung weiter durch das Gel, allerdings mit stark verminderter Mobilität. Bis zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden nach Auftrennung war weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung des Trennverhaltens zu beobachten. Der Zeitpunkt zur Beendigung des Gellaufes wurde auf den Zeitpunkt festgesetzt, an dem der Xylen – Cyanol Marker aus dem Gel ausgelaufen war, zum einen, um relativ zu Variationen im Laufverhalten des Geles eine reproduzierbare Elektrophoresedauer zu gewährleisten, zum anderen, weil verbleibender Farbstoff den Hintergrund der Silberfärbung erhöhte. Die Dauer des Gellaufes betrug in etwa 3 ½ Stunden.

#### **3.2.7 DGGE - Analyse der 16S rRNA Genfragmente von Isolaten**

Die Typstämme der OTUs wurden mittels DGGE - Analyse untersucht, um herauszufinden, ob je Organismus lediglich eine oder mehrere Banden im Gel nachweisbar sind, wo die jeweiligen Positionen der 16S rRNA Genfragmente im Gel sind und ob sich aus dem Schmelzverhalten und der resultierenden Positionen der Banden im DGGE - Gel Rückschlüsse auf die taxonomische Position der untersuchten Organismen ziehen lassen. Außerdem sollte untersucht werden, ob der Vergleich der Bandenmuster eines Gemisches PCR - amplifizierter 16S rRNA - Fragmente Seite an Seite im DGGE - Gel mit amplifizierten Fragmenten aus Umwelt - DNA Hinweise auf die Abundanz kultivierbarer Taxa im Ökosystem ziehen lassen. Die Ergebnisse der DGGE - Analyse sind in Abbildung 56 dargestellt.



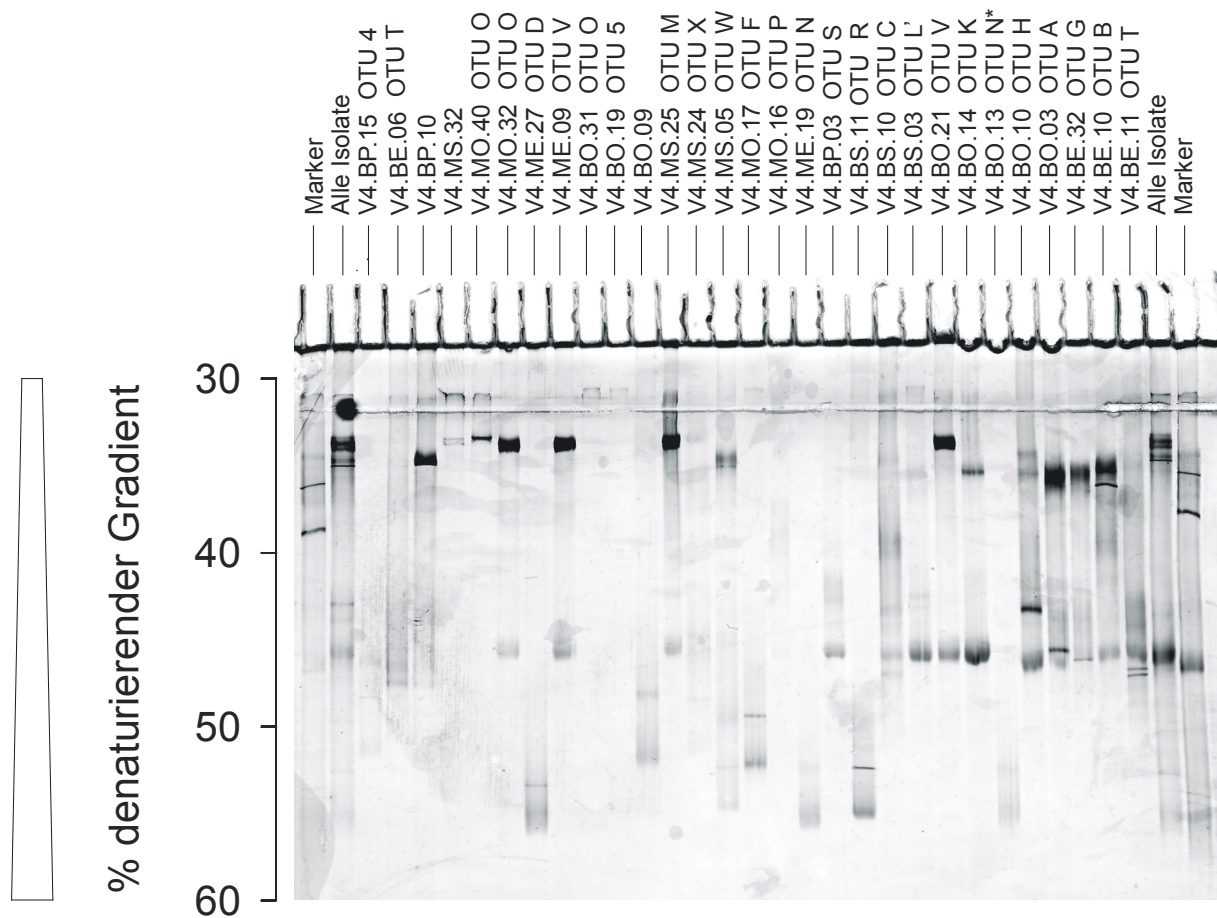


Abbildung 56: DGGE - Analyse von 16S rRNA Genfragmenten aus Reinkulturen der abundanten OTUs. 16S rRNA - Genfragmente einer Länge von etwa 600 nt wurden mit dem Primerpaar GC-16-F-341 ↔ 16-R-907 amplifiziert.

Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

- Die Isolate schmolzen bei Konzentrationen denaturierender Agenzien zwischen 20 % und 50 %.
- Eine absolute Angabe eines Schmelzpunktes von 16S rRNA Genfragmenten war nicht möglich, da der Schmelzpunkt im denaturierenden Gradienten gelbedingte Unterschiede aufwies und partiell denaturierte Banden im Gel trotz drastisch verringerter Mobilität weiterhin im elektrischen Feld wanderten. Unterschiede in der Bestimmung des Schmelzpunktes konnten bis zu 5 % [Konzentration denaturierender Agenzien] betragen. Die relative Anordnung der Banden einzelner Isolate zueinander erwies sich in einem Seite an Seite Vergleich auf einem Gel allerdings als konstant.
- Eine Reihe von Isolaten wies mehr als eine Bande bei der DGGE - Analyse auf. Prinzipiell können natürlich durch Kontamination oder nicht genügende Reinigung der Reinkulturen zusätzliche Banden auftreten, welche die 16S rRNA Genfragmente der Kontaminanten darstellen. Da aber die verwendeten Kulturen sowohl mikroskopisch wie

auch makroskopisch homogen waren und weder bei LMW - RNA - Profil - Analyse noch bei Sequenzierung des 16S rRNA Gens Hinweise auf eine mögliche Kontamination der Stämme vorhanden war, wird davon ausgegangen, daß es sich bei den untersuchten Stämmen um Reinkulturen handelt. Folglich kann nicht davon ausgegangen werden, daß jede Bande eines DGGE - Gels eine einzelne Spezies repräsentiert.

- Verallgemeinernde Rückschlüsse auf die taxonomische Position der Isolate anhand des Laufverhaltens bzw. der Bestimmung des Schmelzpunktes frei nach dem Motto „ $\gamma$  - Proteobakterien bei 33 – 35 %, *Actinobacteria* größer als 40 %“ sind nicht möglich, da oberhalb des Genus - Levels der Schmelzpunkt der 16S rRNA Genfragmente oft nicht mit der taxonomischen Position der Isolate korreliert (Alle folgenden Angaben zum Schmelzpunkt dienen lediglich der Veranschaulichung der Beziehungen zwischen dem Schmelzverhalten der Isolate im Vergleich untereinander. Die Angaben sind in Tabelle 23 aufgelistet, beziehen sich auf die in Abbildung 56 bestimmten Werte und können zwischen verschiedenen Gelläufen variieren):

Die Schmelzpunkte der 16S rRNA - Genfragmente der *Actinobacteria* stimmten für die Vertreter der OTUs D, R, N und N\* sehr gut überein. Bei allen Vertretern traten zwei Banden bei 41 und 44 % auf. Für OTU T, (*Bacillus* sp., *Firmicutes* Niedrig-G+C) wurden zwei Banden bei 35 und 36 % nachgewiesen.

Wenig Übereinstimmung zeigte sich für die  $\alpha$ - Proteobakterien. In dem Gel, das Abbildung 56 zugrundeliegt, wurden folgende Schmelzpunkte bestimmt: OTU A 34 %, OTU F 38 / 41 %, OTU H 32 %, V4.BO.09 37 / 41 % und V4.BP.10 23 %.

Ebenso differieren die Schmelzpunkte der Gamma - Proteobakterien erheblich. Es ergaben sich in Abbildung 56 für OTU 4 37 %, OTU B 24 %, OTU C 32 / 35 / 36 %, OTU G 35 %, OTU K 24 %, OTU L' 31 / 32 %, OTU P 33 %, OTU S 33 %, OTU W 23 / 38 % und für OTU X 36 %.

Die 16S rRNA Genfragmente der untersuchten Flavobakterien (OTU M, V sowie das Isolat V4.MS.32) und der eukaryotischen Isolate (drei Vertreter der OTU O) besaßen Banden bei 22 %.

- Die Bandenmuster eines Gemisches getrennt amplifizierter 16S rRNA Genfragmente der untersuchten Isolate waren nach erfolgter DGGE - Analyse schwer auszuwerten. Problematisch war, daß die einzelnen Banden der Isolate eine sehr schwache Intensität besaßen und deswegen das reproduzierbare Erkennen der Banden schwierig war. Die Menge aufgetragener DNA pro Gelspur ließ sich nicht beliebig erhöhen, da bei einem Auftrag der Menge an DNA, durch die eine zweifelsfreie Erkennung aller Banden gewährleistet worden wäre, Überladungserscheinungen und damit Störungen des Laufverhaltens der betreffenden Gelspur beobachtet wurden.
- Das Bandenmuster eines Gemisches einzeln amplifizierter 16S rRNA Genfragmente von Isolaten unterscheidet sich von dem Bandenmuster eines amplifizierten DNA - Gemisches dieser Isolate (Daten nicht gezeigt).

OTU	untersuchter Stamm	nächster 16S rRNA Verwandter	Phylogenetische Position	Schmelzpunkt DGGE [% denat.]
A	V4.BO.03 <sup>T</sup>	<i>Sphingomonas / Erythrobacter like sp.</i>	$\alpha$ -Proteo	34
B	V4.BE.10 <sup>T</sup>	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	24
C	V4.BS.10	<i>Vibrio sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	32, 35, 36
D	V4.ME.27 <sup>T</sup>	<i>Rhodococcus fascians like sp.</i>	Actinobacteria	41, 44
F	V4.MO.17	<i>Manganese oxidizing isolate</i>	$\alpha$ -Proteo	38, 41
G	V4.BE.32 <sup>T</sup>	<i>Alteromonas macleodii</i>	$\gamma$ -Proteo	35
H	V4.BO.10 <sup>T</sup>	<i>Brevundimonas intermedia</i>	$\alpha$ -Proteo	32
K	V4.BO.14 <sup>T</sup>	<i>Psychrobacter glacinicola like sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	24
L'	V4.BS.03 <sup>T</sup>	<i>Acinetobacter sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	31, 32
M	V4.MS.25 <sup>T</sup>	<i>Flavobacterium medit. group M</i>	CFB	22
N	V4.ME.19 <sup>T</sup>	<i>Nocardioides medit. group N</i>	Actinobacteria	41, 44
N*	V4.BO.13	<i>Nocardioides medit. group N*</i>	Actinobacteria	41, 44
O	V4.BO.31 <sup>T</sup>	<i>Rhodotorula sp.</i>	Fungi	22
O	V4.MO.32	<i>Rhodotorula sp.</i>	Fungi	22
O	V4.MO.40	<i>Rhodotorula sp.</i>	Fungi	22
P	V4.MO.16 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas stutzeri like sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	33
R	V4.BS.11 <sup>T</sup>	<i>Arthrobacter medit. group R</i>	Actinobacteria	41, 44
S	V4.BP.03 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas synxantha like sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	33
T	V4.BE.06 <sup>T</sup>	<i>Bacillus sp.</i>	Firmicutes LGC	35, 36
T	V4.BE.11	<i>Bacillus sp.</i>	Firmicutes LGC	35, 36
V	V4.ME.09 <sup>T</sup>	<i>Flavobacterium medit. group V</i>	CFB	22
V	V4.BO.21	<i>Flavobacterium medit. group V</i>	CFB	22
W	V4.MS.05 <sup>T</sup>	<i>Deleya aquamarina like sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	23, 38
X	V4.MS.24	<i>Marinobacter sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	36
4	V4.BP.15 <sup>T</sup>	<i>Stenotrophomonas maltophilia like sp.</i>	$\gamma$ -Proteo	37
nd	V4.BP.10	<i>Roseobacter like sp.</i>	$\alpha$ -Proteo	23
nd	V4.BO.09	<i>Caulobacter sp.</i>	$\alpha$ -Proteo	37, 41
nd	V4.MS.32	<i>Cyclobacterium like sp.</i>	CFB	22

Tabelle 23: Schmelzpunkte von 16S rRNA Genfragmenten ausgewählter Stämme im denaturierenden Gradientengel. Die Werte beziehen sich auf das in Abbildung 56 dargestellte Gel. Abkürzungen: ähnl. ähnlich,  $\alpha$ -Proteo, Alpha – Proteobakterien; CFB, Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroides – Phylum;  $\gamma$ -Proteo, Gamma-Proteobakterien; Firmicutes LGC, Firmicutes mit niedrigem G+C – Gehalt („low G+C“); medit. mediterran; <sup>T</sup>, Typstamm der OTU

### 3.2.8 Analyse der Bandenmuster aus amplifizierter Umwelt-RNA

Schließlich wurden partielle 16S rRNA Gene aus Umwelt – Nucleinsäureextrakten amplifiziert und mittels DGGE - Analyse analysiert. Für die Analyse wurden Proben von den Stationen S1 und S2 eingesetzt. Datum der Probennahme war der 06.04.1995 für Station S1 und der 03.04.1995 für Station S2. Das DGGE – Gel ist in Abbildung 57 dargestellt.

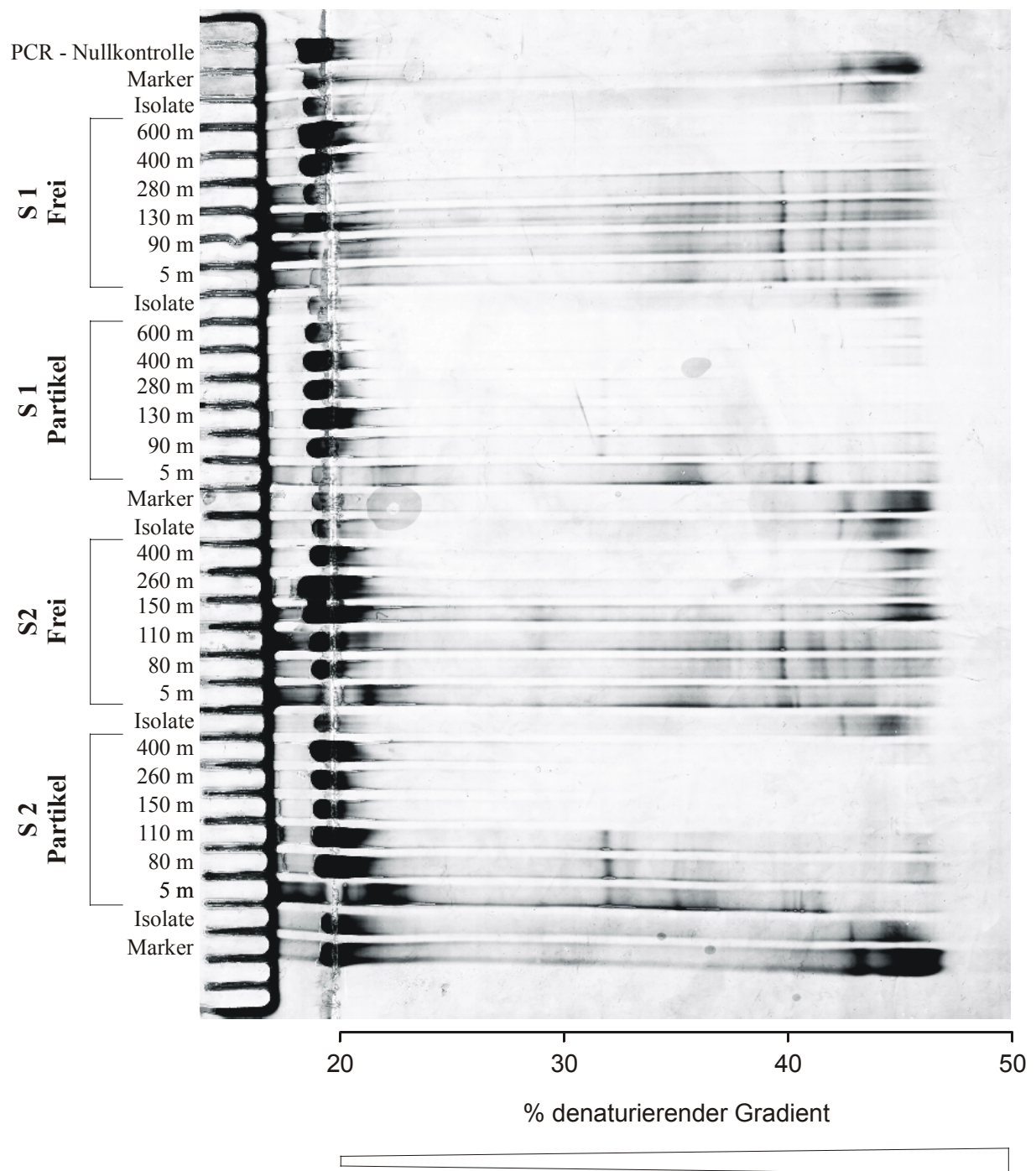


Abbildung 57: DGGE - Analyse partiell amplifizierter 16S rRNA Gene aus Probenmaterial von den Stationen S1 und S2. Datum der Probennahmen: S1, 06.04.1995; S2, 03.04.1995. Densitometrische Kurven ausgewählter Bandenmuster sind in Abbildung 58 dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Folgende Tendenzen ließen sich bei dem Vergleich der Bandenmuster des in Abbildung 57 bzw. Abbildung 58 dargestellten DGGE - Gels feststellen:

- In der Fraktion  $> 1 \mu\text{m}$  (partikelgebundene Fraktion, P-Fraktion) waren ungefähr 10 abundante Banden nachzuweisen. Zwischen 14 und 20 abundante Banden traten in der freilebenden Fraktion auf. Neben den abundanten Banden wurden in beiden Fraktionen zahlreiche schwache Banden beobachtet, deren Intensitäten teilweise nahe an der Detektionsgrenze lagen.
- Unterschiede in den Bandenmustern traten vor allem im Vergleich zwischen dem Probenmaterial aus der partikelgebundenen und der freilebenden Fraktion auf. Daraus wurde geschlossen, daß sich die partikelgebundene von der freilebenden Fraktion deutlich unterscheidet.
- Dagegen ähnelten sich die Bandenmuster der Proben von der freilebenden und der partikelgebundenen Fraktion im Vergleich zwischen Station S1 und Station S2. Zwei stark ausgeprägte Banden der partikelgebundenen Fraktionen von den Stationen S1 und S2 traten in dem in Abbildung 57 dargestellten Gel im Gradienten bei einer Konzentration denaturierender Agenzien (% DG) von 29 % und 31 % DG auf. Vier abundante Banden, die in dem Probenmaterial der freilebenden Fraktionen auftraten, waren bei 37 %, 39 %, 40 % und 42 % DG lokalisiert.
- Die Bandenmuster der Proben aus 5 m Wassertiefe unterschieden sich teilweise deutlich vom Rest des Profils. Charakteristisch für diese Tiefenstufe ist das Auftreten von Banden bei 21- 22 % DG, die das Vorkommen von Flavobakterien andeuten könnten.
- In den Proben aus allen Fraktionen beider Stationen traten mehr oder weniger stark ausgeprägte Banden im Bereich zwischen 43 % und 45 % DG auf. Der Anteil der OD der Banden aus dieser Region des Gradienten an der Gesamt - OD aller Banden je Spur nimmt mit zunehmender Tiefe zu.
- Das Bandenmuster eines Gemisches amplifizierter 16S rRNA Genfragmente abundanter Isolate - OTUs unterschieden sich von dem Bandenmuster, das bei der PCR - Amplifikation aus Umwelt-DNA beider Stationen und beider Fraktionen entstand. Lediglich in den Regionen zwischen 21 % und 22 % DG und zwischen 43 % und 45 % DG waren sowohl beim OTU - Gemisch als auch bei der Umwelt-DNA Banden zu beobachten.

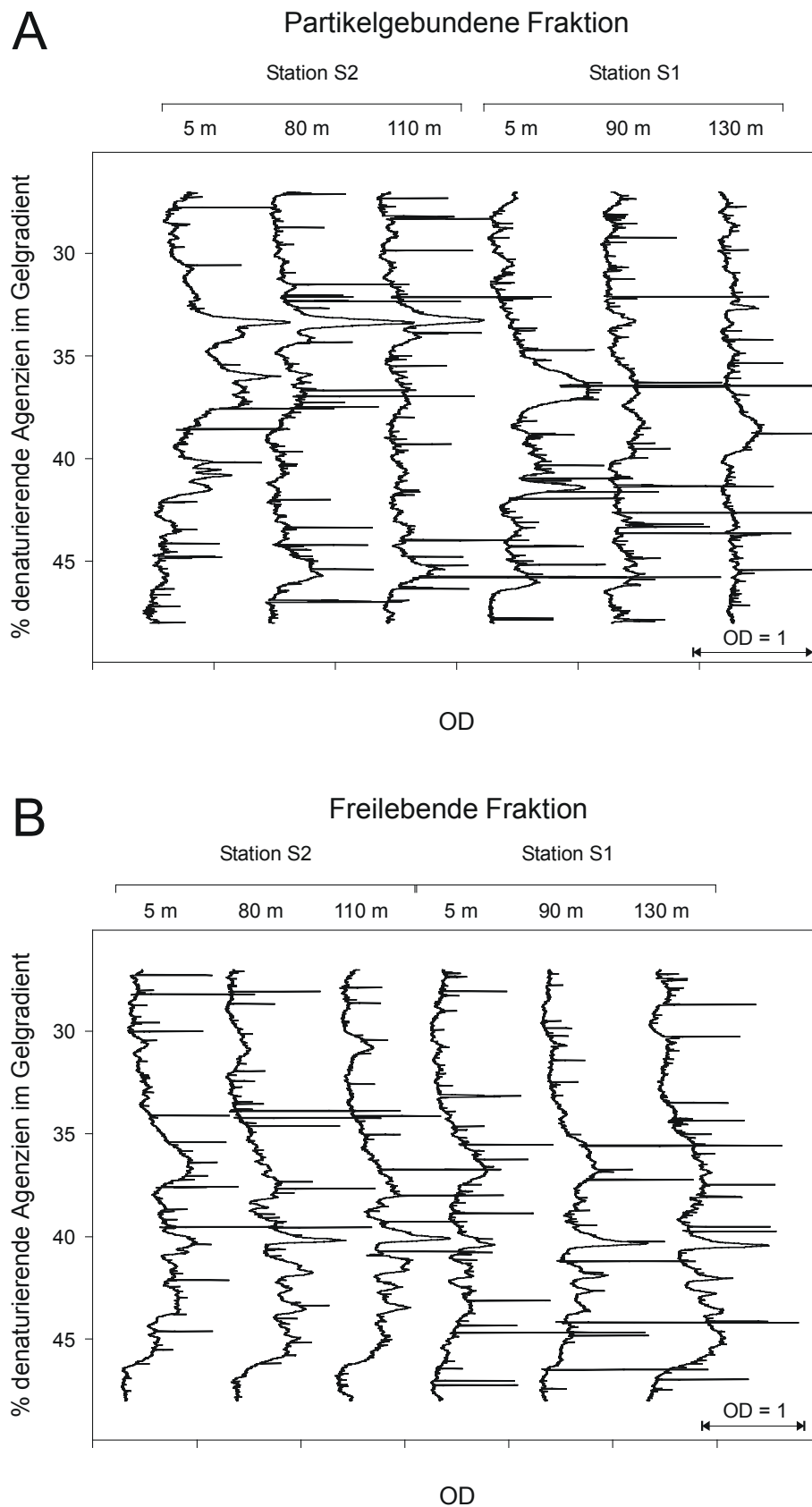


Abbildung 58: Densitometrische Kurven von ausgewählten Gelscans der in Abbildung 57 dargestellten DGGE – Profile. Störungen im Gelhintergrund verursachen charakteristische scharfe, hohe, nadelförmige Spitzen in den Pherogrammen und stellen keine DNA - Banden dar. A: partikelgebundene Fraktion; B: freilebende Fraktion.

### **3.2.8.1    *Partikelgebundene Fraktion Station S1***

Die DGGE - Bandenmuster der Proben aus 5 m Wassertiefe unterschieden sich deutlich von denen der Proben aus den darunterliegenden Wasserschichten. Im Unterschied zu den Proben aus 90 m und darunter traten bei der Probe aus 5 m fünf Banden bei 21 % - 22 % DG auf. Weiterhin wurde in der Probe aus 5 m Tiefe nicht die prägnante Bande bei 29 % DG beobachtet, die ansonsten bei allen Proben der partikelgebundenen Fraktion nachweisbar war. Bei den Proben aus 90 m Wassertiefe und darunter traten mehrere Banden im Bereich zwischen 37 % und 39 % mit einer prägnanten Bande bei 38 % DG auf. Diese prägnante Bande läuft im Gel ungefähr auf der selben Höhe wie die entsprechenden prägnanten Banden der freilebenden Fraktion von der gleichen Station S1. Die Bande könnte also ein Taxon repräsentieren, das an dieser Station sowohl in der partikelgebundenen als auch in der freilebenden Fraktion vorkommt. Fernerhin traten Banden im Bereich zwischen 41% und 45% DG auf.

### **3.2.8.2    *Partikelgebundene Fraktion Station S2***

Deutliche Unterschiede traten zwischen der Probe aus 5 m Tiefe und dem Rest der Wasserproben hervor: In 5 m Tiefe waren 5 - 6 Banden bei ca. 21 % DG, 4 Banden bei 32 % - 33 % DG und vier Banden bei 36 % - 38 % DG zu finden, die sich schon ab 80 m Tiefe nicht mehr nachweisen ließen. Eine kräftige Bande bei 29 % DG fand sich dagegen sowohl in Probenmaterial aus der Wasseroberfläche, wie auch in den darunterliegenden Wasserschichten.

In den darunterliegenden Wasserschichten traten Banden im Bereich von 32 - 33 % und 36 - 38 % DG auf, deren Anteil an der spurinternen Gesamt - OD jedoch mit zunehmender Tiefe sank - mit der Folge, daß diese Banden schwächer wurden. Die Banden im Bereich von 43-45 % DG nahmen jedoch mit zunehmender Wassertiefe an Stärke zu. Die beiden für die partikelgebundene Fraktion charakteristischen Banden bei 29 % und 31 % DG blieben in allen Wassertiefen abundant.

### **3.2.8.3    *Freilebende Fraktion Station S1***

Vier prägnante Banden dominierten dieses Profil. Sie fanden sich im Gelgradienten bei Konzentrationen von 37 %, 39 %, 40 % und 42 % DG. Zusätzlich traten folgende Banden auf: In den Proben aus 5 m Tiefe bei 21 % - 22 % DG, in den Proben aus 90 m und 130 m Tiefe bei 32 % - 35 % DG.

### **3.2.8.4 Freilebende Fraktion Station S2**

Die Bandenmuster aus Proben der freilebenden Fraktion an S2 wurde, ebenso wie die entsprechenden Proben der freilebenden Fraktion von S1 von vier Banden dominiert, die im Gradienten bei 37 %, 39 %, 40 % und 42 % DG lokalisiert waren. Die Probe aus 5 m Wassertiefe unterschied sich wiederum deutlich von den Proben aus den darunterliegenden Wassertiefen. Zusätzlich zu den abundanten Banden der Proben aus darunterliegenden Wasserschichten traten Banden in folgenden Regionen auf: 20 - 21 %, 32 - 33 % und 36 - 37 % DG. Folgende Tendenzen ließen sich im Vergleich der Bandenmuster feststellen: Die Bedeutung der Banden bei 21 - 22 % denat. war an der Oberfläche am höchsten, die Stärke dieser Banden nahm mit zunehmender Wassertiefe ab. In 90 m und 130 m Tiefe gewannen eine Reihe von Banden in der Region zwischen 34 % und 36 % an Abundanz, verschwanden aber mit zunehmender Wassertiefe. Ab einer Tiefe von 280 m gewannen die Banden bei 43 - 45 % DG an Intensität.

### **3.2.9 Sequenzierung ausgeschnittener DGGE-Banden**

Nach erfolgter Analyse der Bandenmuster sollte die Identität abundanter, charakteristischer Banden durch Sequenzierung des partiell amplifizierten 16S rRNA Genfragmentes geklärt werden. Zunächst mußte geklärt werden, inwiefern sich Banden aus Gelen ausschneiden, die DNA-Fragmente eluieren und reamplifizieren lassen. Zunächst wurde versucht, DNA-Banden aus der konventionellen Acrylamid - N,N' - Methylenbisacrylamid (BIS) Gelmatrix (Raymond & Weintraub, 1959) auszuschneiden, DNA mit Hilfe des „crush and soak“ – Protokolles (siehe (Sambrook *et al.*, 1989)) zu eluieren und dann entweder direkt in die Sequenzierungsreaktion einzusetzen oder das Eluat mit dem Primerpaar 16-F-357 und 16-R-907 zu reamplifizieren, ein Aliquot des PCR - Produktes in der DGGE - Analyse neben PCR - Produkten aus dem ursprünglichen marinen Probenmaterial aufzutragen und ein zweites Aliquot des selben PCR - Produktes in die Sequenzierungsreaktion einzusetzen. Leider war es nicht möglich, aus Silber- bzw. SybrGold gefärbten DGGE - Gelen ein PCR - Produkt, bzw. eine auswertbare Sequenzreaktion zu erhalten. Selbst eine zweiminütige mechanische Zerkleinerung der ausgeschnittenen Gelstückchen mit silikonisierten Glasperlen im Dismembrator führte offensichtlich nicht zur Elution der Genfragmente. Dieser Befund ist konsistent mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (Muyzer, ) und wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das amplifizierte Fragment mit ca. 600 nt Länge (> 550 nt amplifiziertes 16 SrRNA-Genfragment + rd. 40 nt GC - Clamp + 2 x ca. 20 nt Primer) deutlich jenseits der Cutoff - Grenze für eine Elution von Nucleinsäurefragmenten durch Diffusion liegt. Deswegen erwies es sich als notwendig, eine andere Gelmatrix zur Analyse von 16S rRNA – Genfragmenten einzusetzen.



Als Gelmatrix wurde dann eine Acrylamid - N,N' – Bis(acryloyl)cystamin (BAC) – Matrix eingesetzt (Hansen, 1976), (Righetti, 1983), (Chiari & Righetti, 1995). Der Crosslinker BAC enthält eine Disulfidbrücke, die mit Thiolen aufgespalten werden kann. Auf diese Art war es möglich, ausgeschnittene Gelstücke mit Reagenzien wie z.B.  $\beta$  - Mercaptoethanol zu verflüssigen, und das gewünschte DNA-Fragment zu eluieren. Nach Entfernung verbleibender Gelreste, Ethanol fällung und Waschung der DNA mit Ethanol war es zwar nicht möglich, das ausgeschnittene und eluierte Genfragment direkt in die Sequenzierreaktion einzusetzen, das Eluat konnte aber reamplifiziert und das erhaltene PCR - Produkt anschließend sequenziert werden.

### **3.2.9.1.1 Vergleich des Bandenmusters reamplifizierter Banden mit Umweltproben**

Ausgewählte Umweltproben wurden, wie für die DGGE - Analyse beschrieben, amplifiziert und auf PAA-BAC Gele aufgetragen. Aus PAA – BAC Gelen wurden einzelne DGGE – Banden ausgeschnitten und 16S rRNA – Genfragmente durch Mercaptoethanol – Fällung eluiert. Aufgrund der Schärfe der Banden, resultierend in sehr schmalen Peaks und aufgrund des „Verschleppens“ von Banden mit unterschiedlichen Schmelzpunkten entlang der Spurränder erwies sich das Ausschneiden einzelner Banden als schwierig. Daß zusammen mit dem ausgeschnittenen Fragment zumindestens noch weitere, unterschiedliche Banden ausgeschnitten wurden, konnte, gelinde gesagt, zumindestens nicht ausgeschlossen werden. Das Problem war zunächst, sicherzustellen, daß die im weiteren Verlaufe kreierte Sequenz auch tatsächlich der Sequenz der ausgeschnittenen Bande entsprach und nicht derjenigen eines mitgeschleppten, kontaminierenden DNA – Fragmentes. Zunächst wurde deshalb versucht, das Eluat ohne weitere Amplifikation zu sequenzieren, ausgehend von der Annahme, eine lineare PCR – Amplifikation (wie sie die Sequenzierungsprozedur schließlich darstellt) würde die Sequenz der zahlenmäßig am stärksten vorhandenen DNA – Fragmente, also der ausgeschnittenen Banden – und nicht der kontaminierenden DNA – Fragmente entsprechen. Leider erfolgte bei der direkten Sequenzierung der eluierten DNA- Fragmente keine lineare PCR – Amplifikation mit fluoreszenzgelabelten Nucleotiden. Mögliche Fehlerursachen stellen entweder zu geringe in die Sequenzierungsreaktion eingesetzte DNA – Mengen dar oder aber Rückstände der Mercaptoethanol – Fällung inhibierten zu stark die Sequenzierungs - PCR.

### **3.2.9.1.2 Analyse der Sequenzen aus reamplifizierten Banden**

Deswegen wurde eine andere Strategie eingeschlagen: Zunächst wurde das Eluat aus der Mercaptoethanol – Extraktion einer weiteren PCR – Amplifikation zur Vermehrung und Erhöhung der Reinheit der in die Sequenzierung eingesetzten DNA - Menge unterzogen. Da

bei der herkömmlichen PCR – Amplifikation die eingesetzten DNA – Mengen geringer als bei der Sequenzierungs – PCR sind, ist der Einfluß PCR - inhibierender Substanzen geringer und die Wahrscheinlichkeit, ein PCR – Produkt zu erhalten erhöht sich entsprechend. In einem zweiten Schritt sollte das erhaltene PCR – Produkt mit einem Volumen von insgesamt 100 µl in zwei Teile aufgeteilt werden: 80 µl dieser 100 µl wurden auf einem PAA – BIS DGGE Gel Seite an Seite neben amplifizierten 16S rRNA Genfragmenten aus dem Gesamt – DNA – Extrakt der entsprechenden Station und Tiefenstufe aufgetragen, um zu vergleichen, welche Bande des Original – Nucleinsäureextraktes nun amplifiziert wurde. Die verbleibenden 20 µl des PCR – Amplifikationsproduktes wurden nach weiterer Aufreinigung zur Sequenzierung verwendet. Um den Einfluß möglicher präferentieller Amplifikationen auszuschließen, wurde jedes DNA – Fragment mit zwei konservierten Primern sequenziert: Die verwendeten Primer, zum einen der 5' - 3' gerichtete Vorwärts - Primer 16F357, zum anderen der 3' - 5' gerichtete Rückwärts – Primer 16R907 entsprachen jeweils dem zur DGGE – PCR Amplifikation verwendeten Primerpaar. Eine Sequenz wurde als eindeutig betrachtet, wenn die Sequenzreaktionen mit beiden Primern dieselbe eindeutige Sequenz lieferten. Um zusätzlich die Sequenzen zu überprüfen, wurden zwei weitere Sequenzreaktionen an einer stark konservierten Stelle des 16S rRNA Genfragmentes durchgeführt: Eine Sequenzierung mit dem Primer 16R518 ergab eine ca. 160 nt lange Sequenz, die an der *E. coli* – Position 357 des 16S rRNA Gens endet, mit dem Primer 16F534 wurde eine etwa 370 nt lange Sequenz erhalten, die an der *E. coli* Position 907 endete.

Eine Analyse der DGGE – Amplifikate zeigte, daß in der Regel die PCR - Reamplifikation einer ausgeschnittenen Bande und die anschließende Trennung des erhaltenen PCR – Produktes auf einem DGGE – Gel wieder ein komplexes Bandenmuster und keine einzelne Bande mit einer definierten Position innerhalb des Gradienten ergab (siehe Abbildung 60). Die Sequenzierung der PCR – Produkte zeigte auch in den meisten Fällen das folgende Ergebnis: Die ersten ca. 70 – 90 auf den Sequenzierprimer folgenden, stark konservierten Nucleotidpositionen waren in der Sequenz zwar eindeutig lesbar, erlaubten aber keinerlei Identifikationen, da diese Positionen in der ganzen eubakteriellen Domäne konserviert sind (siehe Abbildung 61). Beim Übergang in hypervariable Regionen traten sehr schnell mehrdeutige Bandenmuster auf, jede Position der Sequenz wurde durch mehrere Basen besetzt und das Herauslesen einer einzelnen Sequenz dadurch unmöglich. Es zeigte sich, daß der Anteil uneindeutiger Sequenzen stieg, wenn das Auflösungsvermögen des zum Ausschneiden der PAA – BAC – Banden verwendeten DGGE - Geles niedrig war. Trotzdem konnten einige eindeutige Sequenzen erhalten werden, bei denen in allen Fällen die mit dem Vorwärts – und Rückwärts – Primer erhaltenen Sequenzen übereinstimmten. Daraus wurde geschlossen, daß eine präferentielle Amplifikation bei der Sequenzierungs – PCR als unwahrscheinlich betrachtet werden kann.

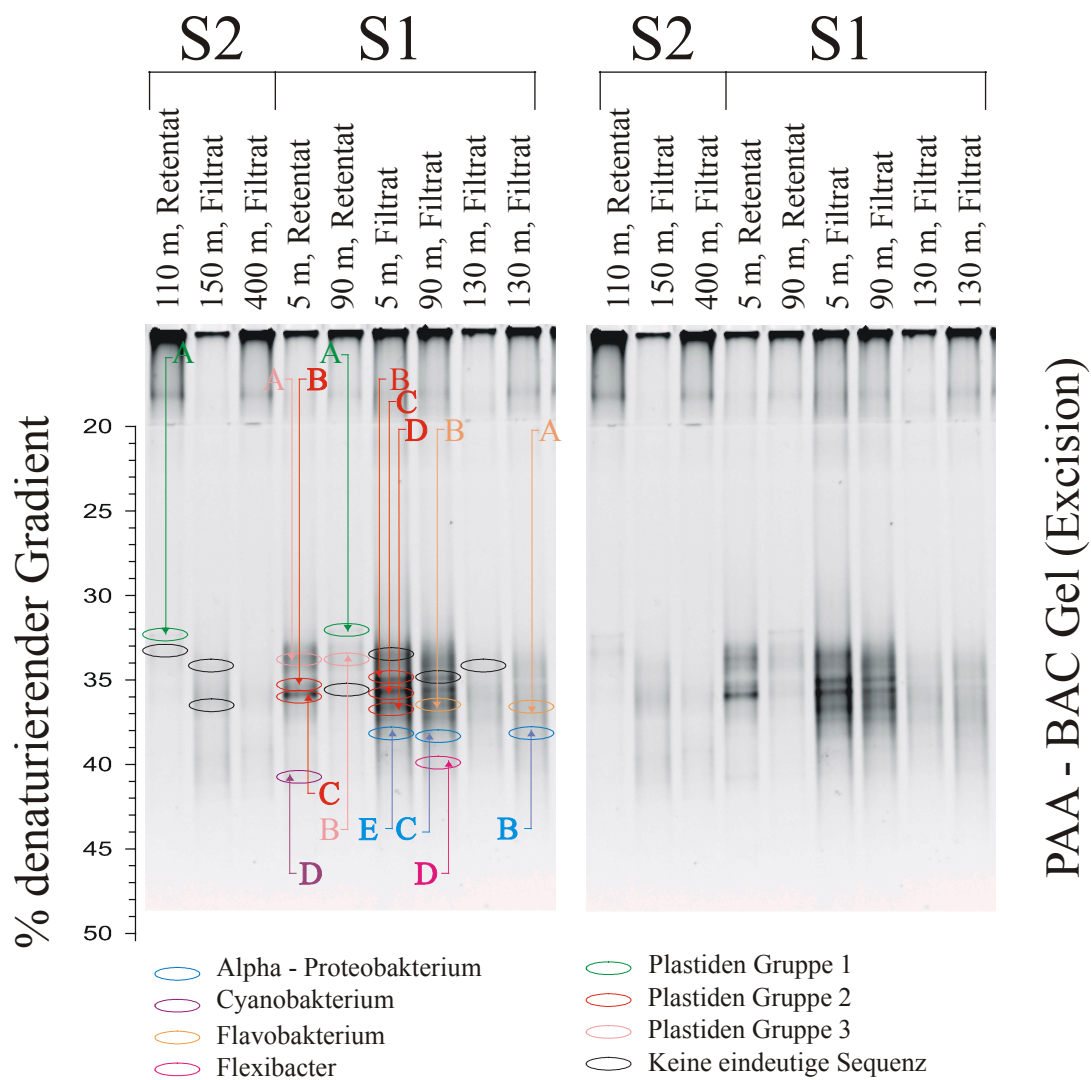


Abbildung 59: Positionen einiger ausgeschnittener Banden im PAA – BAC –DGGE – Gel. Banden, die nach PCR – Reamplifikation eine Identifizierung der repräsentierten Organismen anhand eindeutig lesbarer Sequenzen ihrer 16S rRNA Genfragmente erlaubten, sind farbig eingekreist. Die gewählte Farbe spiegelt die taxonomische Position der repräsentierten Organismen wieder. Die DGGE - Analyse der reamplifizierten Banden ist in Abbildung 60 dargestellt.

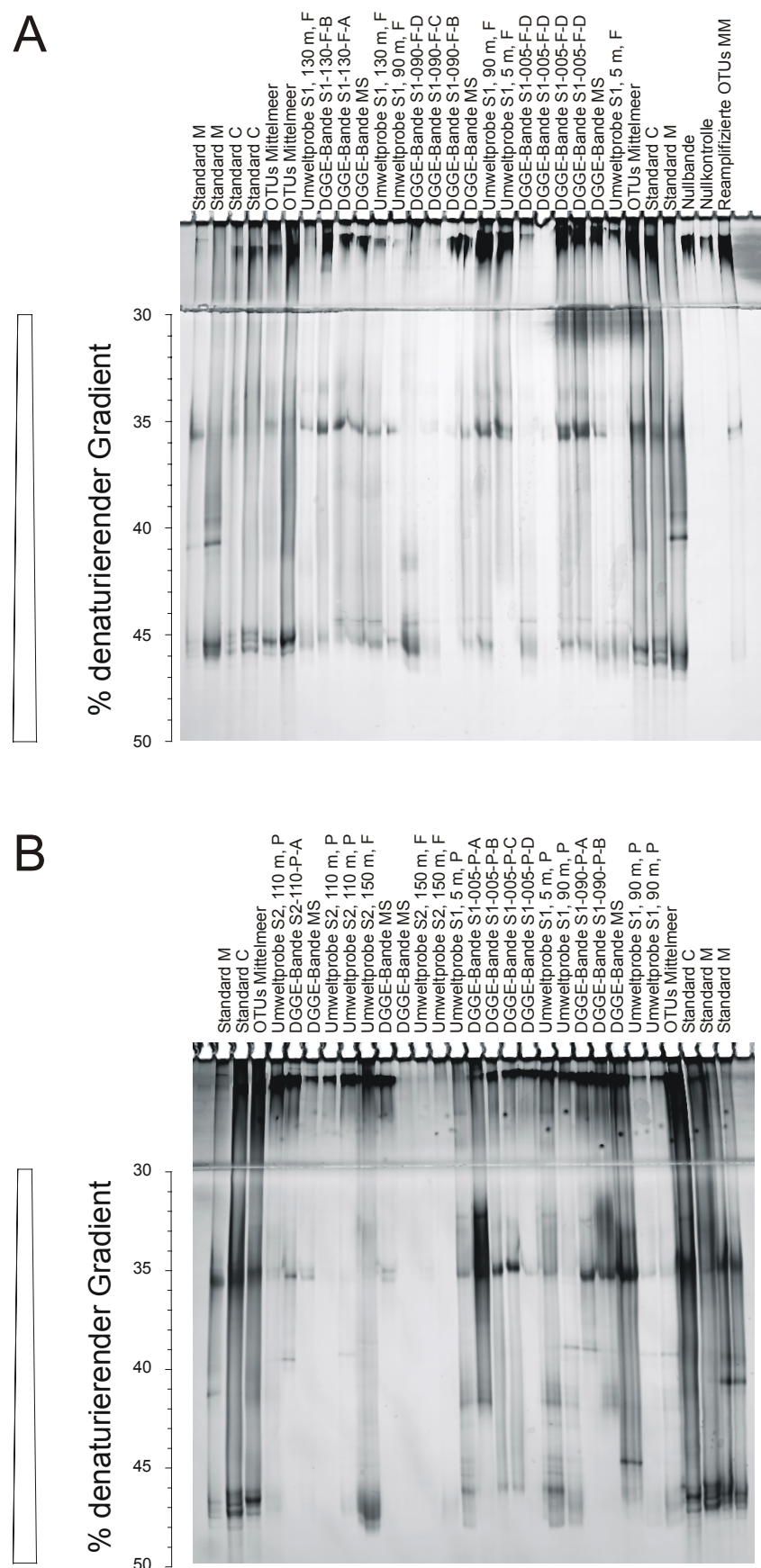


Abbildung 60 A und B: DGGE - Analyse der ausgeschnittenen und reamplifizierten DGGE - Banden aus Abbildung 59.

## DGGE - Bande S2-110-P-A Primer 16-F-341

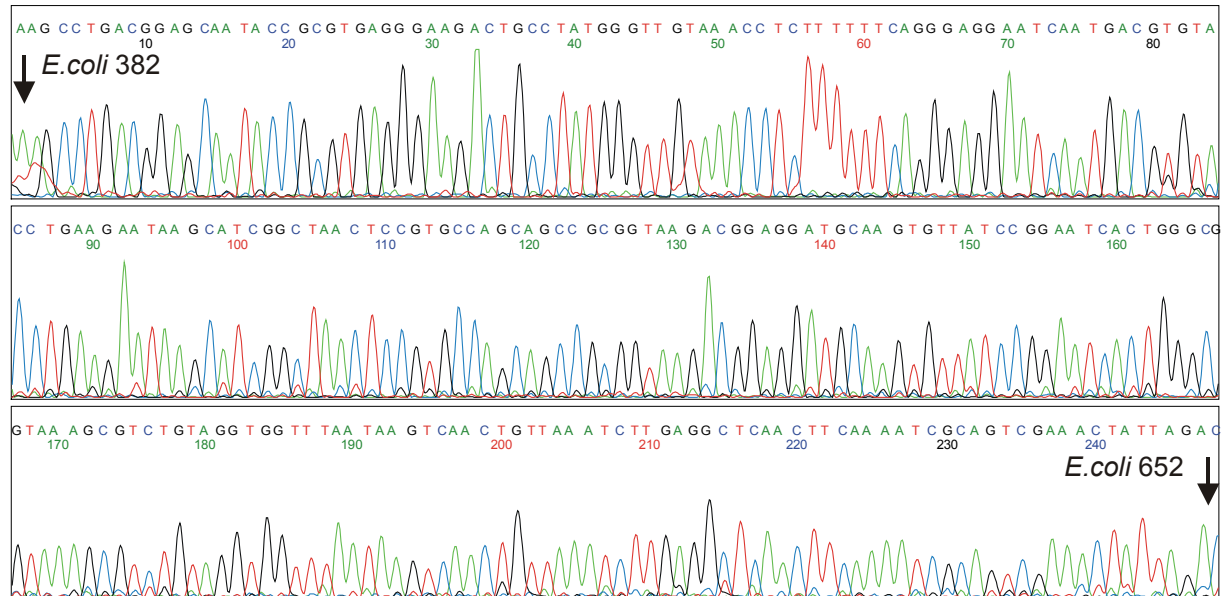
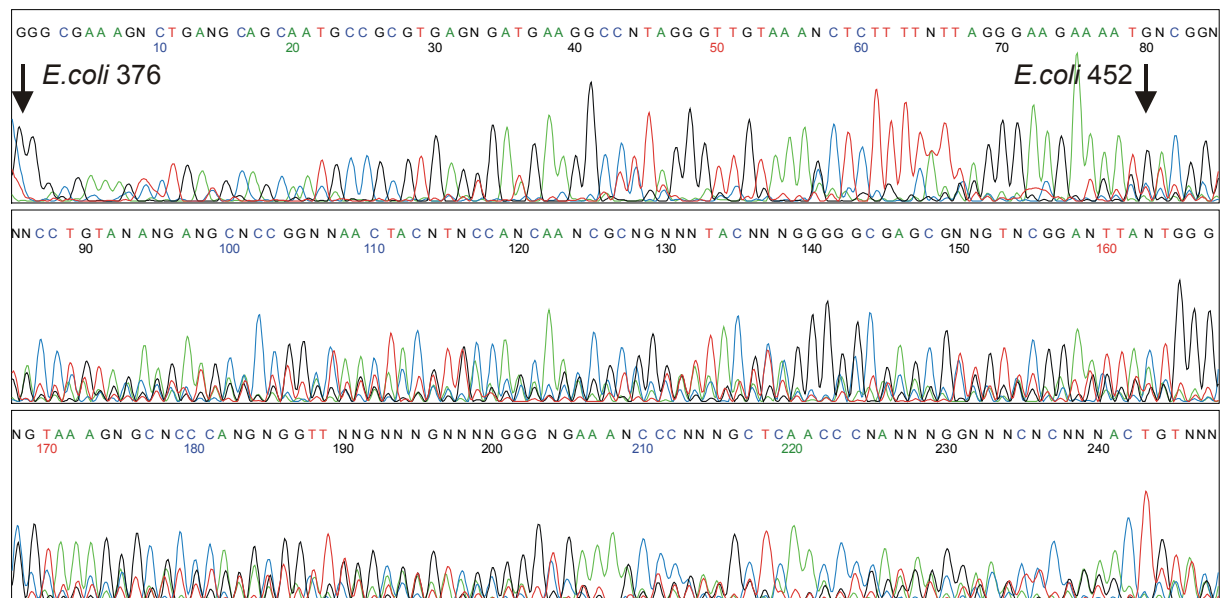
DGGE - Bande, S2, 400 m, Fraktion 1  $\mu\text{m} > x > 0,2 \mu\text{m}$ , multiple Sequenzen

Abbildung 61: Rohdaten einer eindeutig lesbaren und einer nicht eindeutig lesbaren Sequenz, erhalten aus ausgeschnittenen und reamplifizierten DGGE - Banden. Pfeile markieren die jeweils spezifizierte *Escherichia coli* - homologe Position des 16S rRNA Gens. Die nicht eindeutig lesbare Sequenz enthält 16S rRNA - Genfragmente mehrerer Organismen. Die Lesbarkeit der zweiten Sequenz bricht schlagartig beim Übergang des konservierten Bereiches zur variablen Region an der *E. coli* - homologen Position 452 des 16S rRNA Genfragmentes ab.

Insgesamt wurden 21 eindeutige Sequenzen von ausgeschnittenen DGGE – Banden erhalten, die allerdings auch einige uneindeutige Sequenzpositionen enthielten. Diese uneindeutigen Sequenzpositionen wurden in den nachfolgenden Ähnlichkeitsberechnungen nicht berücksichtigt. Die Sequenzen wurden nach folgendem Schema benannt, wie an zwei Beispielen gezeigt werden soll:

S1-005-F-C

S2-260-P-A

S1 bzw. S2 gibt an, ob die Probe, aus welcher der DNA Extrakt zur PCR – Amplifikation und DGGE – Analyse erhalten wurde, von Station S1 oder Station S2 erhalten wurde. Die zweite Position gibt die Tiefe in m an, aus welcher das Probenmaterial stammt. An dritter Position wird angegeben ob das Probenmaterial die partikelgebundene oder freilebende Fraktion repräsentiert, P (partikelgebunden) steht für die Fraktion  $> 1 \mu\text{m}$ , freilebend repräsentiert die Fraktion mit Organismengrößen zwischen  $1 \mu\text{m}$  und  $0,2 \mu\text{m}$ . Die letzte Position stellt eine alphabetische Bezeichnung der Bandenposition des ausgeschnittenen Gelstückes im DGGE – Gel dar. A bezeichnet diejenige aller ausgeschnittenen Banden einer Gelspur, die den niedrigsten Schmelzpunkt aufweist und deswegen im DGGE – Gel die kürzeste Laufstrecke absolviert hat, B die Bande mit dem zweitniedrigsten Schmelzpunkt usw. S2-260-P-A bezeichnet also die DGGE – Bande mit dem niedrigsten Schmelzpunkt aus der partikelgebundenen Fraktion der Probe, welche an Station S2 aus 260 m Tiefe erhalten wurde. S1-005-F-C ist demnach die ausgeschnittene Bande mit dem drittniedrigsten Schmelzpunkt der Probe von der freilebenden Fraktion an Station S1.

Von diesen 21 Sequenzen ließen sich drei Sequenzen den Alpha – Proteobakterien zuordnen, vier Sequenzen zeigten mehr oder weniger nahe Verwandtschaften zu den Flavobakterien, eine Sequenz war cyanobakterieller Herkunft und die restlichen 13 Sequenzen schließlich standen den 16S rRNA Gensequenzen von Plastiden nahe. Diese Sequenzen offenbar plastidärer Herkunft ließen sich in drei Gruppen einteilen: Gruppe 1 zeigt starke Ähnlichkeit zu plastidären Sequenzen von *Skeletonema costatum* bzw. *S. pseudocostatum*, Gruppe 2 besaß keine näheren Verwandtschaften zu Sequenzen in der Datenbank und Gruppe 3 schließlich war ähnlich zu plastidären Sequenzen von Prasinophyten.

Folgende Tendenzen ließen sich bei dem Vergleich der Sequenzen der 16S rRNA - Genfragmente feststellen:

- Beim Vergleich der DGGE – Sequenzen untereinander wurden zueinander ähnliche Sequenzen aus vergleichbarer Position im PAA – BAC Gel ausgeschnitten.
- Alle nicht – cyanobakteriellen Sequenzen wurden aus DNA – Extrakten der freilebenden Fraktion ( $1 \mu\text{m} > x > 0,2 \mu\text{m}$ ) erhalten – mit einer Ausnahme, der den Flavobakterien nahestehende Organismus, der durch die Bande S2-260-P-A repräsentiert wird. Die Bande wurde aus der Probe vom 03.04.1995, Station S2, 260 m Tiefe amplifiziert.

- Alle plastidenähnlichen Sequenzen sowie die cyanobakterielle Sequenz wurden aus DNA - Extrakten der partikulären Fraktion ( $> 1 \mu\text{m}$ ) erhalten, mit drei Ausnahmen aus der Plastidengruppe 3: S1-005-F-B, S1-005-F-C und S1-005-F-D. Alle drei Banden wurden DNA der Probe vom 06.04.1995, Station S1 aus 5 m Tiefe amplifiziert.
- Es wurden keine Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu Gamma – Proteobakterien und gram – positiven Bakterien erhalten.
- Keine Sequenz entsprach der Sequenz eines der Isolate.

Eine taxonomische Analyse der aus DGGE-Gelbanden erhaltenen Sequenzen findet sich im Diskussionsteil zusammen mit den Sequenzanalysen der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997).

### **3.2.10 SSCP - Analyse**

Um das mittels DGGE - Analyse erhaltene Ergebnis der Analyse zu verifizieren, wurden die Umweltproben mittels SSCP - Analyse untersucht. Die verwendete Variante der SSCP - Analyse beinhaltet die PCR - Amplifikation eines Fragmentes der 16S rRNA, dem Verdau eines der beiden Doppelstränge mittels  $\lambda$  - Exonuclease sowie die anschließende Auftrennung des erhaltenen Fragmentes auf einem Polyacrylamidgel unter nicht denaturierenden Bedingungen (Schwieger & Tebbe, 1998). Als Primerpaar für die partielle Amplifikation wurden die Primer 16-F-530a und 16-R-907 ausgewählt. Beide Primerpaare setzen an universell konservierten Stellen des 16S rRNA - Genes an. In der in Abschnitt 3.2.10.1 bzw. Abbildung 62 dargestellten Analyse gelang die PCR - Amplifikation entsprechender Fragmente für Vertreter aller charakterisierten OTUs einschließlich von eukaryotischen Vertretern.

#### **3.2.10.1 SSCP – Analyse der Genfragmente aus Umwelt – DNA**

Zunächst wurden 16S rRNA Genfragmente vom Probenmaterial der Stationen S1 (06.04.1995) und S2 (03. und 08.04.1995) amplifiziert und Seite an Seite auf einem SSCP – Gel analysiert, um Unterschiede in der Biozönosestruktur zwischen allen untersuchten Proben zu erfassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 62 und Abbildung 63 dargestellt.

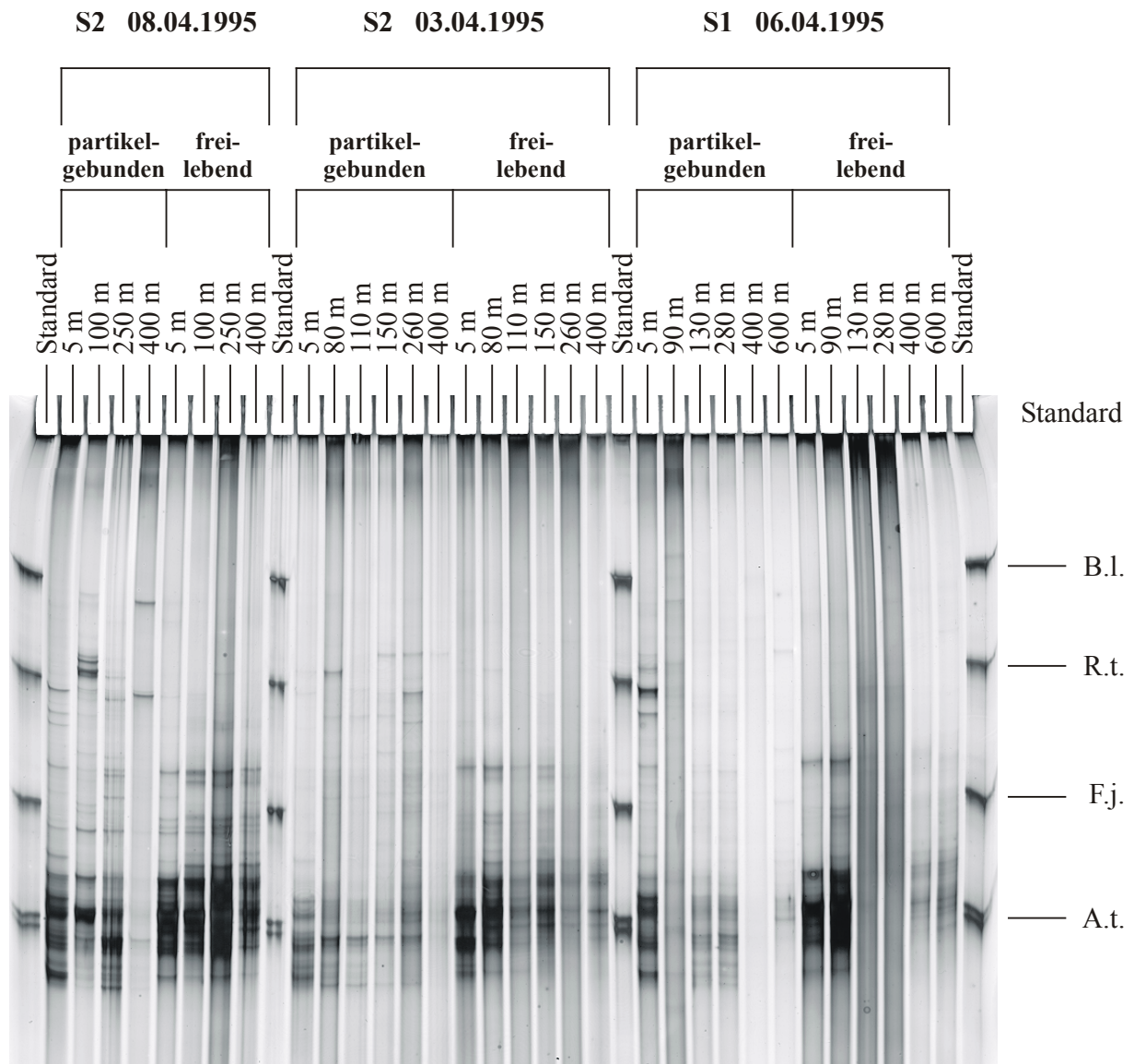


Abbildung 62: SSCP – Analyse der 16S rRNA – Gene aus Nucleinsäureextrakten des Probenmaterials der Stationen S1 und S2. Abkürzungen: B.l., *Bacillus licheniformis*; R.t., *Rhizobium trifolii*; F.j., *Flavobacterium johnsoniae*; A.t., *Agrobacterium tumefaciens*; S1, Station S1; S2, Station S2. Densitometrische Kurven der Gelscans siehe Abbildung 63.



Die Ergebnisse der SSCP - Analyse bestätigten die Daten, die bei der DGGE - Analyse gewonnen wurden. Auffällig war die große Ähnlichkeit der Bandenmuster der freilebenden bakteriellen Fraktionen. Für die Proben der  $1 \mu\text{m} > x > 0,2 \mu\text{m}$  Fraktion ähnelten sich die erhaltenen Bandenmuster an Station S1 (06.04.1995) und S2 (03. und 08.04.1995) sehr stark. Offensichtlich waren in verschiedenen Tiefen des freien Wasserkörpers mikrobielle Lebensgemeinschaften sehr ähnlicher Zusammensetzung abundant.

Hingegen manifestierten sich in den partikelgebundenen Fraktionen ( $> 1 \mu\text{m}$ ) der Proben deutlichere Unterschiede. Die Proben der partikelgebundenen Fraktion an Station S2 am 03.04.1995 zeigten mit Ausnahme der 5 m Tiefenstufe hohe Ähnlichkeiten, die auf eine weitgehend homogene Zusammensetzung der partikelgebundenen Fraktionen zwischen 80 m und 400 m schließen ließen. Am 08.04.1995 unterschieden sich die Bandenmuster dieser Fraktion in jeder Tiefenstufe deutlich voneinander. Daraus konnte auf das Vorhandensein unterschiedlicher bakterieller Lebensgemeinschaften des Partikelaufwuchses geschlossen werden, die möglicherweise eine unterschiedliche Partikelzusammensetzung reflektieren könnten. An Station S1 wiesen die Proben der Tiefenstufen 130 m bis 600 m in der Fraktion  $> 1 \mu\text{m}$  zueinander eine sehr hohe Ähnlichkeit auf. Von diesen Proben wie auch untereinander unterschieden sich die beiden Proben der 5 m und der 90 m Tiefenstufe deutlich.

Detailliert wurden im Hinblick auf Unterschiede zwischen partikelgebundenen und freilebenden Fraktion, tiefen- und stationsabhängiger Verteilung folgende Beobachtungen gemacht:

- An der Oberfläche wiesen in den Proben vom 03.04.1995 (S1) und 06.05.1995 (S2) die Bandenmuster der 5 m und der 80 m bzw. 90m Wasserprobe in der partikelgebundenen und der freilebenden Fraktion zahlreiche gemeinsame abundante Banden im Bandenmuster auf. In den Proben aus dem daruntergelegenen Wasserkörper waren keine gemeinsamen abundanten Banden mehr zwischen partikelgebundener und freilebender Fraktion nachzuweisen.
- Am 06.04.1995 traten an Station S1 keine Unterschiede in der partikelgebundenen Fraktion mit zunehmender Tiefe auf. Die Proben aus der freilebenden Fraktion allerdings ähneln in den aus 5 m und 90 m Tiefe entnommenen Proben den Bandenmustern aus der partikelgebundenen Fraktion und weisen zu dieser einige gemeinsame prägnante Banden auf. Im daruntergelegenen Wasserkörper unterscheiden sich die Proben aus partikelgebundener und freilebender Fraktion vollkommen.
- Die Proben vom 03.04.1995 weisen ebenfalls in den oberflächennahen Proben (5m, 80 m) einige gemeinsame Banden zwischen partikelgebundener und freilebender Fraktion auf. Im daruntergelegenen Wasserkörper sind diese Proben ebenfalls stark unterschiedlich.
- Am 08.04.1995 traten die stärksten abundanten Banden der Bandenmuster in den partikelgebundenen und freilebenden Fraktionen aus allen Tiefenstufen gemeinsam auf. Diese stark ausgeprägten Banden liefen ungefähr in der Höhe des *Agrobacterium tumefaciens* – Standards. Die in der Nähe des *Rhizobium trifolii* und *Flavobacterium johnsoniae* laufenden Banden unterschieden sich deutlich in Abhängigkeit von der Tiefe und der Fraktion.

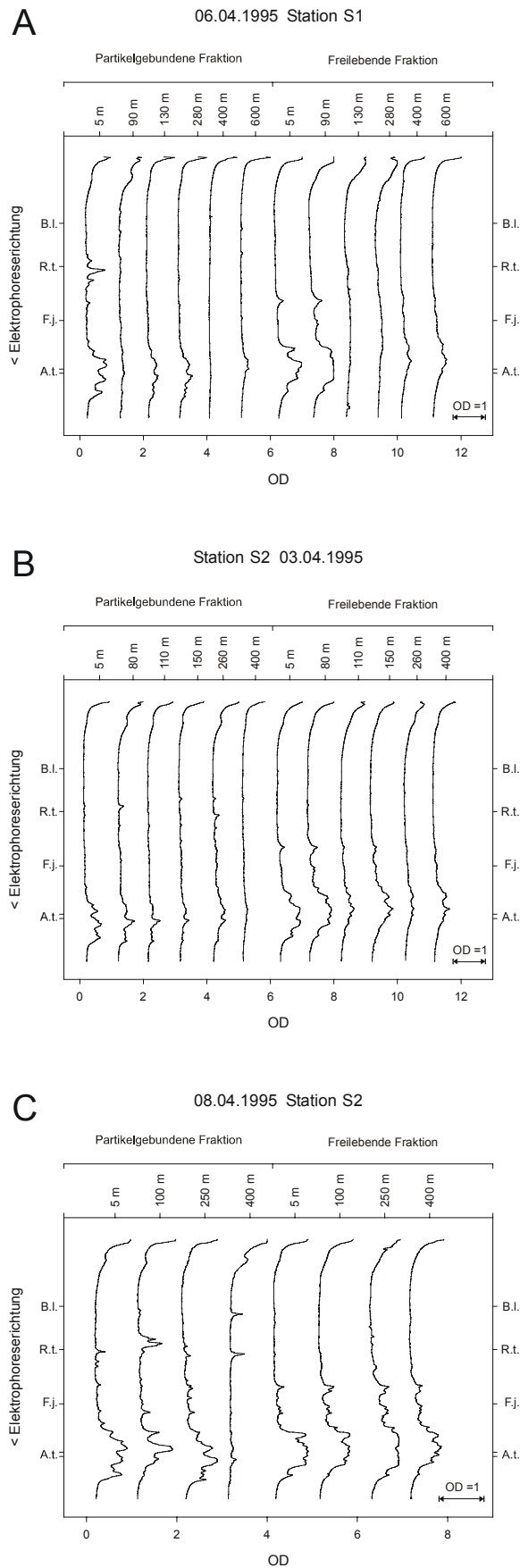


Abbildung 63 A, B und C: Densitometrische Kurven von Gelscans der in dargestellten SSCP – Profile. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 62.

### **3.2.10.2 Vergleich zwischen den 16S rRNA - Genfragmenten aus Isolaten und Umwelt – DNA**

#### **3.2.10.2.1 SSCP - Analyse von 16S rRNA Genfragmenten aus Isolaten**

Um zu überprüfen, ob die Abundanz einzelner Banden der SSCP – Bandenmuster Hinweise auf eine Abundanz isolierter und charakterisierter Mikroorganismen aus den entsprechenden erlaubt, wurden die Umweltproben zusammen mit fünf Standards bestehend aus je vier bis fünf homologen 16S rRNA Genfragmenten der abundantesten OTUs, auf demselben SSCP - Gel analysiert. Die fünf Standards setzten sich jeweils aus fünf getrennt amplifizierten PCR - Produkten zusammen und wurden nach PCR und Aufreinigung der Produkte zusammenpipettiert. Zunächst wurden die fünf mit Buchstaben von A bis E bezeichneten Standards kalibriert, indem sie jeweils gegen die PCR - Produkte der 16S rRNA Genfragmente der betreffenden einzelnen Isolate durch SSCP analysiert wurden. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 64.

Es wurde gezeigt, daß sich die 16S rRNA – Genfragmente von OTUs unterschiedlicher taxonomischer Affiliation mit dieser Methode auftrennen ließen. Die relative Position der 16S rRNA – Genfragmente einzelner OTUs innerhalb eines Gemisch von Genfragmenten von jeweils fünf OTUs unterschiedlicher taxonomischer Affiliation konnte bestimmt werden. Ziel dieses Experimentes war es, möglichst zahlreiche Genfragmente der Vertreter taxonomisch unterschiedlicher, kultivierbarer OTUs auf möglichst wenige Spuren innerhalb eines Geles zusammenzufassen, ohne allerdings eine zu geringe Intensität einzelner Banden durch Zusammenfassung einer zu hohen Anzahl von Genfragmenten und der damit verbundenen Ausdünnung einzelner Genfragmente im Gemisch in Kauf nehmen zu müssen. Es zeigte sich, daß sich einzelne Banden eines Gemisches aus Genfragmenten von fünf taxonomisch unterschiedlichen Organismen in der Regel gut trennen ließen. Somit waren die Voraussetzungen geschaffen worden, um auf den SSCP – Gelen eine möglichst hohe Anzahl von Umweltproben gegen möglichst zahlreiche Genfragmente von Vertretern taxonomisch unterschiedlich kultivierbarer OTUs zu vergleichen, um zu bestimmen, ob einzelne Banden kultivierbarer OTUs auf gleicher Höhe mit Banden aus Umweltproben laufen. 16S rRNA – Genfragmente von 24 OTUs konnten nun zu fünf ‚Standards‘ auf fünf Spuren in einem Gel zusammengefaßt werden (siehe Tabelle 24).

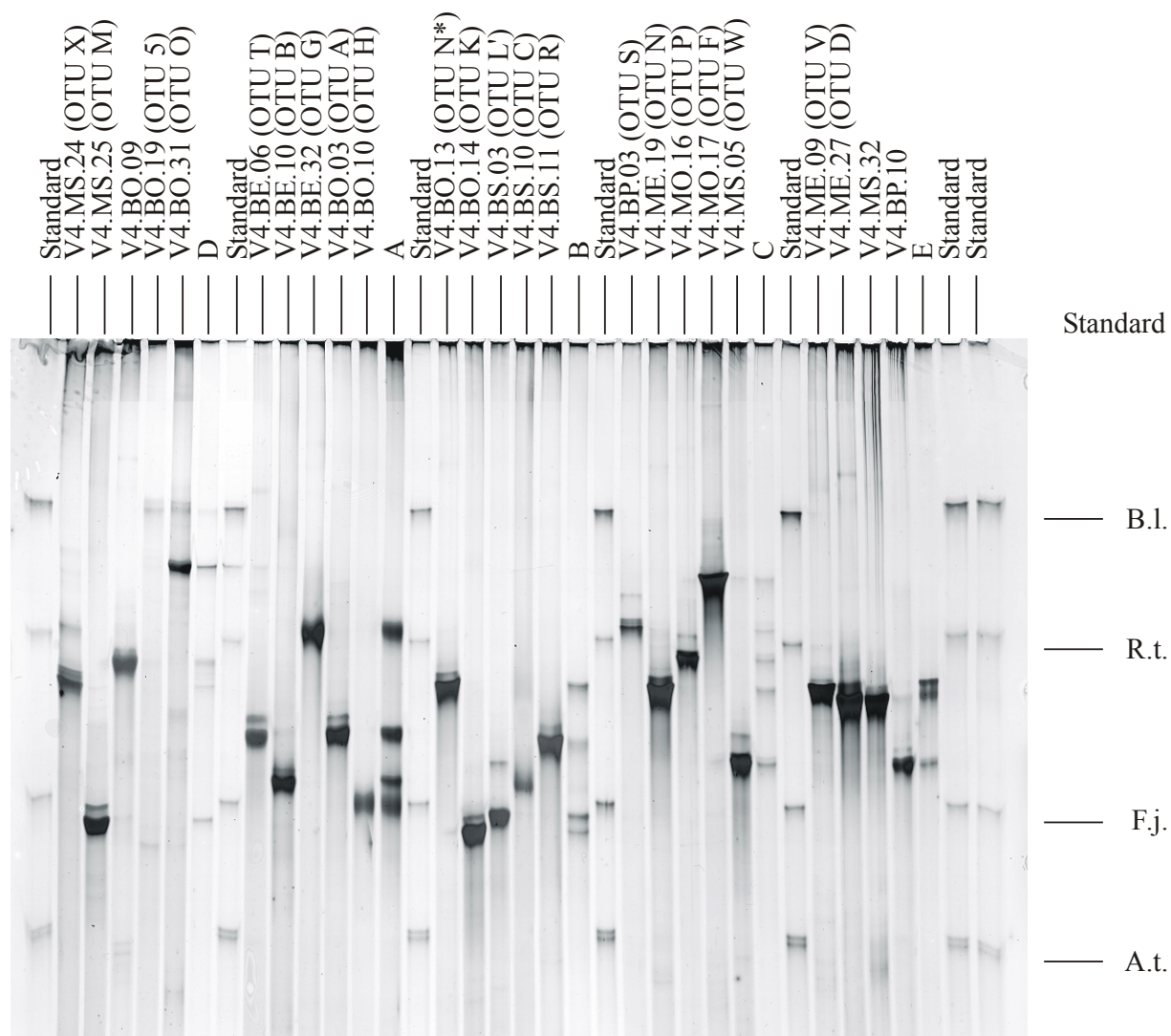


Abbildung 64: SSCP – Analyse zur Kalibrierung der SSCP – Standards A bis E gegen einzelne 16S rRNA – Genfragmente von Isolat. Abkürzungen siehe Abbildung 62. Weitere Erklärungen siehe Text.

In der Reihenfolge von der Auftragstasche zur RF – Front ergab sich für die Abfolge der Banden in den SSCP – Standards A bis E, von Auftragstasche in Elektrophoreserichtung gesehen, folgende Anordnung:

Standard A	V4.BE.32 (OTU G), V4.BO.03 (OTU A), V4.BE.06 (OTU T), V4.BE.10 (OTU B), V4.BO.10 (OTU H)
Standard B	V4.BO.13 (OTU N*), V4.BS.11 (OTU R), V4.BS.10 (OTU C), V4.BS.03 (OTU L'), V4.BO.14 (OTU K)
Standard C	V4.MO.17 (OTU F), V4.BP.03 (OTU S), V4.MO.16 (OTU P), V4.ME.19 (OTU N), V4.MS.05 (OTU W)
Standard D	V4.BO.19 (OTU 5), V4.BO.31 (OTU O), V4.BO.09, V4.MS.24 (OTU X), V4.MS.25 (OTU M)
Standard E	V4.ME.09 (OTU V), V4.ME.27 (OTU D), V4.MS.32, V4.BP.10

Tabelle 24: Abfolge der Banden in den SSCP – Standards A bis E von der Auftragstasche ausgehend in Richtung RF-Front gesehen. Siehe ebenfalls Abbildung 64.

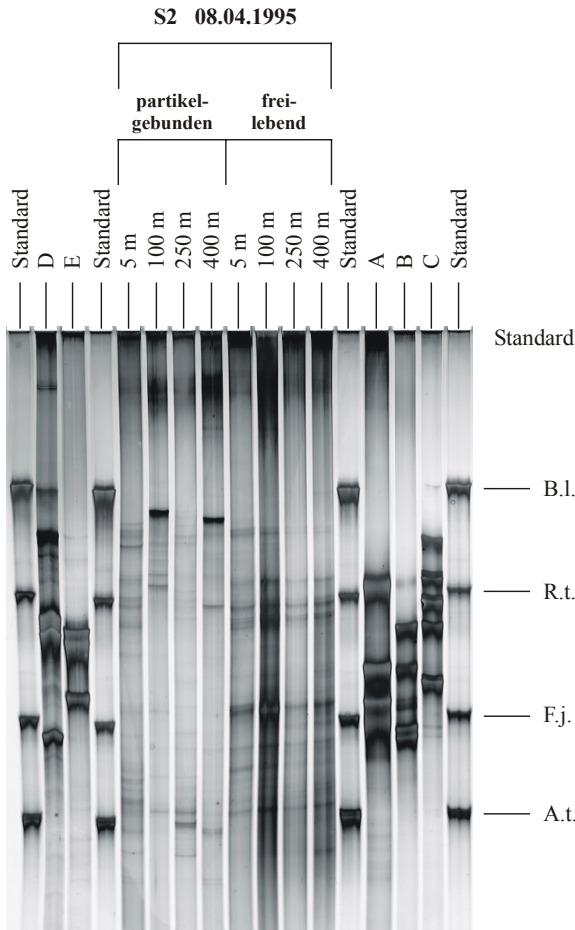
Andererseits zeigte die Bestimmung der relativen Anordnung der Bandenposition von 16S rRNA - Genfragmenten in SSCP – Gelen, daß die Position eines Genfragmentes im SSCP – Gel keine Rückschlüsse auf die taxonomische Position des durch das Genfragment repräsentierten Organismus hatte. Beispielsweise wiesen die zu den Flavobakterien gehörenden Isolate V4.ME.09 (OTU V), V4.MS.32 und die Actinobakterien V4.ME.27 (OTU D), V4.BO.13 (OTU N\*), V4.MO.19 (OTU N) in SSCP – Gelen ein ähnliches Laufverhalten auf. Folglich läßt sich aus einem Vergleich der Bandenpositionen der Genfragmente kultivierbarer OTUs mit Bandenmustern aus Umweltproben für den Fall der Nichtübereinstimmung der Schluß ziehen, daß die betreffenden OTUs in den Umweltproben nur in geringem Maße vertreten sind, der Umkehrschluß aber, die Identifikation einer Bande in einer Umweltprobe aufgrund von Übereinstimmungen im Laufverhalten der 16S rRNA – Genfragmente mit Vertretern kultivierbarer OTUs ist nicht möglich.

#### **3.2.10.2.2 Vergleich der 16S rRNA Genfragmente von Isolaten und Umwelt – DNA**

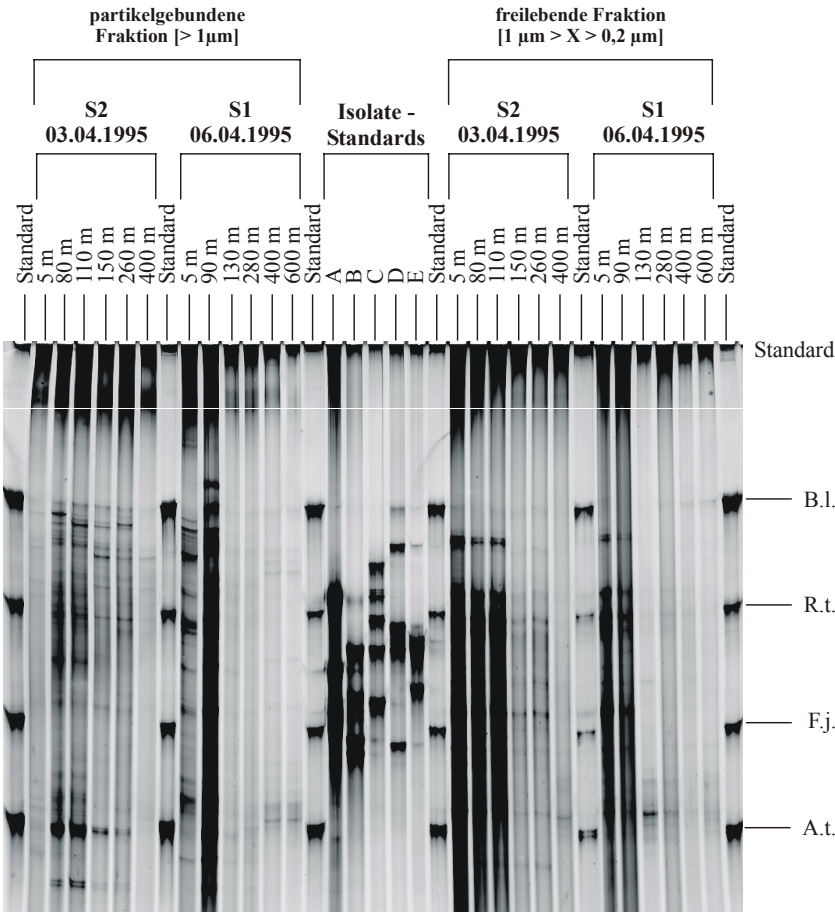
Die 16S rRNA Genfragmente von Isolaten und Umwelt – DNA wurden verglichen, indem die Bandenpositionen der in Absatz 3.2.10.2.1 charakterisierten Isolate – Standards A bis E auf einem SSCP – Gel mit den Bandenpositionen amplifizierter Umwelt DNA verglichen wurden. Ziel war es, festzustellen, ob abundante Banden in Umweltproben auf gleicher Höhe mit Banden aus den Isolate – Standards migrieren, um Hinweise auf die Abundanz häufig isolierter Taxa im Ökosystem zu finden. Das Ergebnis dieser Analyse sind in Abbildung 65 und Abbildung 66 dargestellt.

Abbildung 65 (Seite 48): Vergleich von SSCP – Bandenmustern aus Umwelt – DNA – Extrakten mit SSCP – Bandenmuster ausgewählter bakterieller Isolate. A: Proben vom 08.04.1995, B: Proben vom 03.04.1995 und 06.04.1995. Die Reihenfolge der Banden in den Isolate – Standards A bis E findet sich in Tabelle 24 bzw. Abbildung 64. Densitometrische Kurven ausgewählter Gelscans sind in Abbildung 66 dargestellt.

A



B



Wie in Abbildung 65 und Abbildung 66 dargestellt, liefen folgende Banden der Isolate - Standards auf gleicher Höhe mit Banden aus Umweltproben (im folgenden bezeichnet die Angabe „Position einer Bande von oben“ die relative Position einer Bande gegenüber anderen Banden derselben Gelspur, gesehen von der Auftragstasche in Richtung RF-Front):

Partikelgebundene Fraktion [ $> 1 \mu\text{m}$ ] (im Folgenden PF abgekürzt):

- V4.BE.32 (Standard A, erste Bande von oben) bzw. V4.BP.03 (Standard C, zweite Bande von oben) (Banden laufen auf gleicher Höhe) mit Banden in den Proben S1 (06.04.1995, PF, 5 m, 90 m) und S2 (03.04.1995, PF, alle Tiefenstufen, geringe Intensität; (08.04.1995, PF, 100 m)
- V4.MO.16 (Standard C, dritte Bande von oben) bzw. OTU X (Standard D, dritte Bande von oben) mit Banden in den Proben S2 (03.04.1995, PF, 5m, 80 m, 08.04.1995, PF, 400 m) und S1 (06.04.1995, 5 m, 90 m)
- V4.MO.17 (Standard C, erste Bande von oben) bzw. V4.BO.31 (Standard D, zweite Hauptbande von oben und sehr hoch oben laufende Nebenbande) mit Banden in den Proben S2 (03.04.1995, PF, 80 m, 110 m, 150 m und 260 m)

Freilebende Fraktion [ $1 \mu\text{m} > X > 0,2 \mu\text{m}$ ] (im Folgenden FF abgekürzt):

- V4.BE.10 (Standard A, dritte Bande von oben) mit Banden in den Proben S1 (06.04.1995, FF alle Tiefenstufen) und S2 (03.04.1995, FF, alle Tiefenstufen,; 08.04.1995, freilebende Fraktion, 5 m, 80 m, 110 m)
- V4.BS.10 (Standard B, dritte Bande von oben) mit Banden in den Proben S2 (08.04.1995, FF, alle Tiefenstufen)
- V4.BS.03 (Standard B, vierte Bande von oben) mit Banden in den Proben S2 (08.04.1995, FF, alle Tiefenstufen)
- V4.MO.16 (Standard C, dritte Bande von oben) mit Banden in den Proben S2 (08.04.1995, FF, alle Tiefenstufen)
- V4.BE.32 (Standard A, erste Bande von oben) bzw. V4.BP.03 (Standard C, zweite Bande von oben) (Banden laufen auf gleicher Höhe) mit Banden in den Proben S1 (06.04.1995, FF, 5 m , 90 m) und S2 (03.04.1995, FF, alle Tiefenstufen, starke Intensität (wesentlich höher als im partikelgebundenen Probenmaterial) in den Tiefenstufen 5 m , 80 m 110 m; 08.04.1995, FF, alle Tiefenstufen)

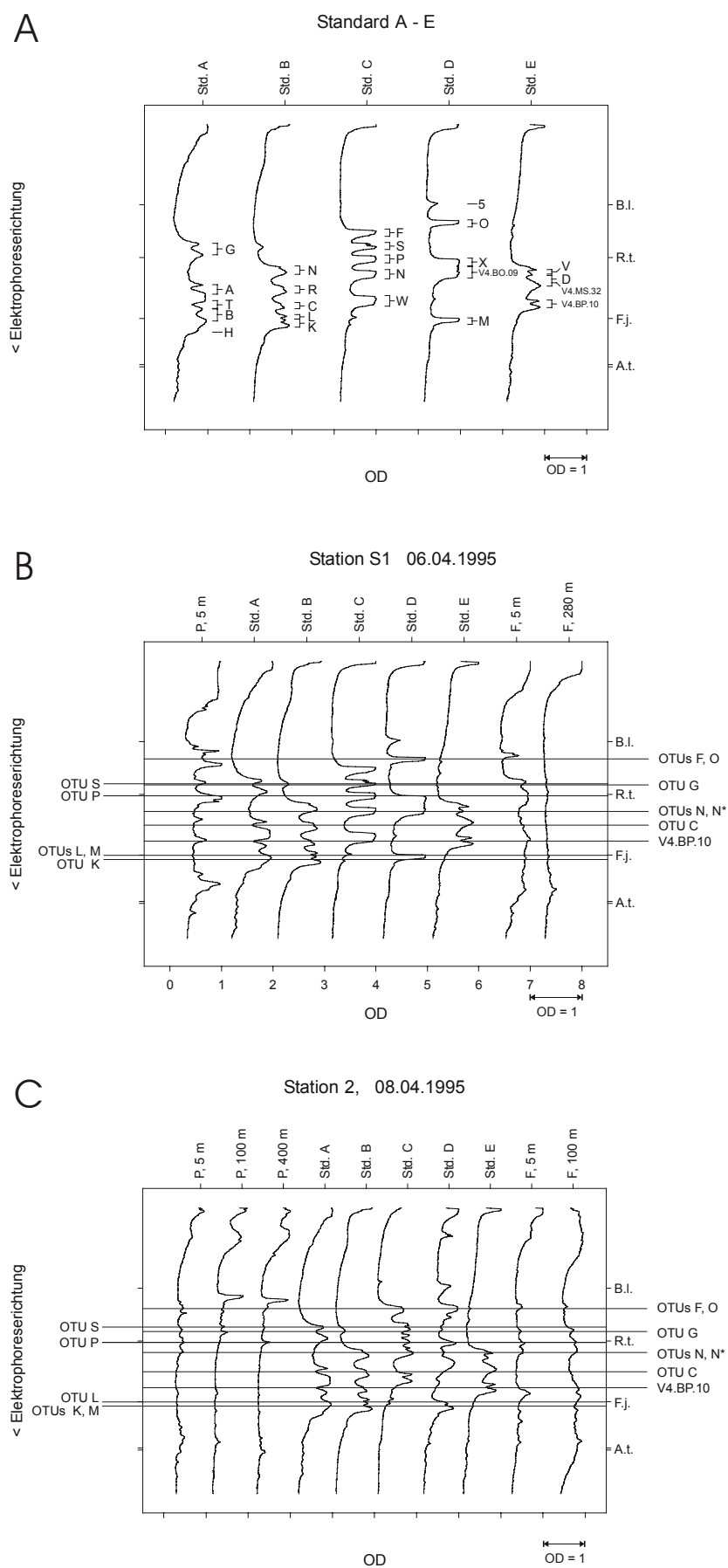


Abbildung 66 A, B und C: Densitometrische Kurven von Gelscans der in Abbildung 65 dargestellten SSCP – Bandenmuster. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 65.



OTU	Unter-sucher Stamm	nächster 16S rRNA Verwandter	Standard Nr., Position der Bande <sup>1</sup>	Partikelgebundene Fraktion	Freilebende Fraktion
<b>B</b>	V4.BE.10 <sup>T</sup>	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	A-3		<b>S1:</b> 06.04.1995, alle Tiefenstufen; <b>S2:</b> 03.04.1995, alle Tiefenstufen; 08.04.1995, 5 m, 80 m, 110 m
<b>C</b>	V4.BS.10	<i>Vibrio sp.</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	B-3		<b>S2:</b> 08.04.1995, alle Tiefenstufen
<b>F</b>	V4.MO.17	<i>Manganese oxidizing isolate</i> , $\alpha$ -Proteobakterien	C-1	<b>S2:</b> 03.04.1995, 80 m, 110 m, 150 m und 260 m	
<b>G</b>	V4.BE.32 <sup>T</sup>	<i>Alteromonas macleodii</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	A-1	<b>S1:</b> 06.04.1995, 5 m, 90 m; <b>S2:</b> 03.04.1995, alle Tiefenstufen (niedr. Intensität), 08.04.1995, 100 m	<b>S1:</b> 06.04.1995, 5 m, 90 m; <b>S2:</b> 03.04.1995, alle Tiefenstufen, (hohe Intensität), 5 m, 80 m 110 m; 08.04.1995, alle Tiefenstufen)
<b>L'</b>	V4.BS.03 <sup>T</sup>	<i>Acinetobacter sp.</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	B-4		<b>S2:</b> 08.04.1995, alle Tiefenstufen
<b>P</b>	V4.MO.16 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas stutzeri like sp.</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	C-3	<b>S1:</b> 06.04.1995, 5 m, 90 m <b>S2:</b> 03.04.1995, 5 m, 80 m; 08.04.1995, 400 m	<b>S2:</b> 08.04.1995, alle Tiefenstufen
<b>S</b>	V4.BP.03 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas synxantha like sp.</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	C-2	<b>S1:</b> 06.04.1995, 5 m, 90 m <b>S2:</b> 03.04.1995, alle Tiefenstufen, (niedr. Intensität); 08.04.1995, 100 m	<b>S1:</b> 06.04.1995, 5 m, 90 m; <b>S2:</b> 03.04.1995, 5 m, 80 m 110 m, (hohe Intensität); 08.04.1995, alle Tiefenstufen
<b>X</b>	V4.MS.24	<i>Marinobacter sp.</i> , $\gamma$ -Proteobakterien	D-3	<b>S1:</b> 06.04.1995, 5 m, 90 m; <b>S2 :</b> 03.04.1995, 5m, 80 m; 08.04.1995, 400 m	<b>S2:</b> 08.04.1995, alle Tiefenstufen

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Vergleich der SSCP – Bandenmuster von Isolaten und Umweltproben. Aufgeführt sind alle OTUs, deren 16S rRNAs – Genfragmente in den SSCP – Gelen auf gleicher Höhe mit einzelnen Banden aus Umweltproben liefen, sowie eine Auflistung der entsprechenden, jeweils auf gleicher Höhe laufenden Banden aus Umweltproben. 1, Die Position der Banden wird wie folgt angegeben: A, B, C, D, E bezieht sich auf den Standard, in dem das Genfragment der OTU enthalten ist (siehe Abbildung 65 und Abbildung 66); 1, 2, 3 ... bezeichnet die erste, zweite, dritte Bande des Standards, gesehen in der Reihenfolge von der Auftragstasche in Elektrophoreserichtung. D3 bezeichnet so die dritte Bande von oben in Standard D. Abkürzung: niedr., niedrig.

Fast alle Stämme, die in gleicher Höhe wandernde Banden wie einzelne Banden aus Umweltproben aufwiesen, gehörten zu den  $\gamma$  - Proteobakterien. Dieses waren: V4.BE.10 (OTU B, *Pseudoalteromonas* sp), V4.BE.32 (OTU G, *Alteromonas macleodii* like sp), V4.BO.19 (OTU 5, *Alcanivorax* like sp.), V4.BP.03 (OTU S, *Pseudomonas synxantha* like sp), V4.BS.03 (OTU L', *Acinetobacter* sp) V4.BS.10 (OTU C, *Vibrio* sp.), V4.MO.16 (OTU P, *Pseudomonas stutzeri* like sp), V4.MS.24 (OTU X, *Marinobacter* sp.). Die einzigen Ausnahmen bildeten zwei OTUs mit auf gleicher Höhe laufenden 16S rRNA Genfragmenten, die zu den  $\alpha$  - Proteobakterien gehörende OTU F, vertreten durch den Stamm V4.MO.17 bzw. die zu den Eukaryoten gehörige OTU O, repräsentiert durch den Stamm V4.BO.31 (*Rhodotorula* sp).

Banden, die in gleicher Höhe wie die folgenden Stämme liefen, wurden nicht gefunden

- $\alpha$  - Proteobakterien: V4.BO.03 (OTU A), V4.BO.09, V4.BO.10 (OTU H), V4.BP.10
- $\gamma$  - Proteobakterien: V4.BO.14 (OTU K), V4.BO.19 (OTU 5), V4.MS.05 (OTU W), V4.MS.25 (OTU Y)
- *Actinobacteria*: V4.BO.13 (OTU N\*), V4.BS.11 (OTU R), V4.ME.19 (OTU N), V4.ME.27 (OTU D)
- *Firmicutes* mit niedrigem G+C-Gehalt: V4.BE.06
- *Flavobacterium* / *Bacteroides*: V4.BE.32 (OTU G), V4.ME.09 (OTU V) V4.MS.32

Unter den zwei Annahmen, erstens, daß die Zellzahlen einzelner OTUs *in situ* mit dem DNA – Gehalt in positiver Korrelation stehen und zweitens, daß die Stärke einzelner Banden in den Bandenmustern den prozentualen Anteil der DNA einer OTU an der Gesamt – DNA in einer Umweltprobe reflektiert, wurde aus diesen Befunden geschlossen, daß zum Zeitpunkt der Probennahmen offensichtlich ein großer Teil zahlenmäßig abundanter OTUs in den Umweltproben und damit *in situ* keine hohe Abundanz aufwiesen. Der Umkehrschluß, daß auf gleicher Höhe mit Banden aus Umweltproben laufende Banden von 16S rRNA – Genfragmenten einzelner Stämme auf eine hohe Abundanz dieser OTU *in situ* schließen läßt, konnte leider nicht gezogen werden: Zahlreiche Genfragmente taxonomisch unterschiedlicher OTUs zeigten in den SSCP – Analysen ein ähnliches Laufverhalten. Beispielsweise liefen zwei Banden taxonomisch sehr unterschiedlicher Organismen in den SSCP – Analysen auf gleicher Höhe: Die 16S rRNA – Genfragmente von OTU F ( $\alpha$  - Proteobakterien) und OTU O (Fungi, Eukarya) ließen sich unter den gewählten Bedingungen nicht auftrennen. Banden aus Umweltproben, die auf gleicher Höhe zu beiden Banden dieser beiden Organismen liefen, ließen sich also nicht eindeutig einem der beiden Taxa zuordnen. Hieraus wurde deutlich, daß ein ähnliches Laufverhalten von Genfragmenten in SSCP – aber auch in DGGE – und 5S rRNA – Profilanalysen generell keine absolut sicheren Rückschlüsse auf die Identität beziehungsweise die taxonomische Affiliation von Organismen erlaubt, die durch einzelne Banden innerhalb der entsprechenden Bandenmuster repräsentiert werden, sondern lediglich Hinweise auf eine mögliche Abundanz einzelner OTUs *in situ* geben kann. Folglich konnte in dieser Analyse gezeigt werden, daß ein großer Teil der abundanten kultivierbaren OTUs nicht die *in situ* abundanten Organismen repräsentieren, der Umkehrschluß, welche der kultivierbaren OTUs auch im Ökosystem zahlenstark vertreten sind, ließ sich jedoch aus den vorgenommenen Analysen nicht ziehen.

### **3.2.10.3 SSCP – Analyse reamplifizierter DGGE - Banden**

Es zeigte sich also, daß die Genfragmente der kultivierbaren Vertreter nicht den abundanten Genfragmenten aus Umweltproben entsprechen und folglich kultivierbare und nicht kultivierbare Mikroorganismen in den untersuchten Wasserproben unterschiedliche taxonomische Positionen besaßen. Aus den ausgeschnittenen Banden der DGGE – Analysen wurden einige unkultivierte Mikroorganismen anhand einer Sequenzanalyse ihrer entsprechenden 16S rRNA Genfragmente charakterisiert (siehe Abschnitt 3.2.9). Allerdings erbrachte der Vergleich der Positionen reamplifizierter DGGE – Banden mit den Banden entsprechend amplifizierter Umwelt – DNA kein eindeutiges Ergebnis: Aufgrund von unspezifischer Reamplifikation wurden je reamplifizierter DGGE – Bande mehrere Banden bzw. komplexe Bandenmuster erhalten (siehe Abbildung 60). Dieses Phänomen erstaunt, da aus den identischen PCR – Produkten der Reamplifikation eindeutige 16S rRNA - Gensequenzen bestimmt werden konnten. Um die Positionen der ausgeschnittenen DGGE – Banden mit den Bandenmustern der SSCP – Analyse zu vergleichen, wurden die ausgeschnittenen DGGE – Banden mit den SSCP – Primern reamplifiziert und Seite an Seite gegen Umwelt – DNA der entsprechenden Proben aufgetragen. Repräsentative Banden für einige taxonomische Gruppen sind in Abbildung 67 und Abbildung 68 dargestellt.

Die Reamplifikation der ausgeschnittenen DGGE – Banden mittels der SSCP – Primer erbrachte eindeutigere Ergebnisse als die entsprechende Reamplifikation mit Hilfe der DGGE – Primer. Zwar kam es, wie bei der DGGE – Amplifikation, auch bei der Reamplifikation mit SSCP – Primern offensichtlich zur Ausbildung von Nebenprodukten in der PCR. Im Agarose – Kontrollgel, mit welchem die PCR – Produkte nach erfolgter Amplifikation kontrolliert wurden, zeigten sich bei den Produkten aus reamplifizierten DGGE – Banden zahlreiche Nebenbanden – im Unterschied zu den PCR - Produkten aus nativer Umwelt – DNA (Daten nicht gezeigt). Diese Banden besaßen diskrete Größen und schienen Dimere oder Polymere der zu amplifizierenden Genfragmente zu sein. Diese Artefakte waren womöglich auf durch die GC - Clamp verursachte Dimerbildung zurückzuführen. Auf die Ausbildung von Artefakten wird im Diskussionsteil näher eingegangen.

Im SSCP – Gel konnten die Positionen von fünf der aus den Sequenzen ausgeschnittener DGGE – Banden bekannten taxonomischen Gruppen bestimmt werden. Die Positionen der identifizierten Gruppen sind in Abbildung 67 dargestellt. Wie bereits in Abschnitt 3.2.10.1 dargestellt, war das Bandenmuster der freilebenden Fraktionen unabhängig vom Probennahmetag und der Probennahmetiefe relativ konstant, während die Proben der partikelgebundenen Fraktionen einen konstanten Anteil mit wenigen, sehr abundanten Banden im unteren Gelbereich (große RF-Werte) und einen variablen Anteil mit einigen, je nach Tiefenstufe und Station unterschiedlichen, abundanten Banden im oberen Gelbereich (kleine RF-Werte) untergliedert (siehe Abbildung 62). Es zeigte sich, daß die Positionen der konstanten abundanten Banden der partikelgebundenen Fraktionen mit den Amplifikaten der Plastidengruppen 1 und 2 übereinstimmen, während der variable Anteil dieser Fraktionen Banden aufwies, die mit den reamplifizierten Banden  $\alpha$  - proteobakterieller und Flexibacter -

ähnlicher Sequenzen übereinstimmten. Die konstant abundanten Banden der partikelgebundenen Fraktion schienen folglich plastidärer Herkunft zu sein, während der bakterielle Teil der partikelgebundenen Fraktionen sehr variabel zu sein schien.

S1 06.04.1995

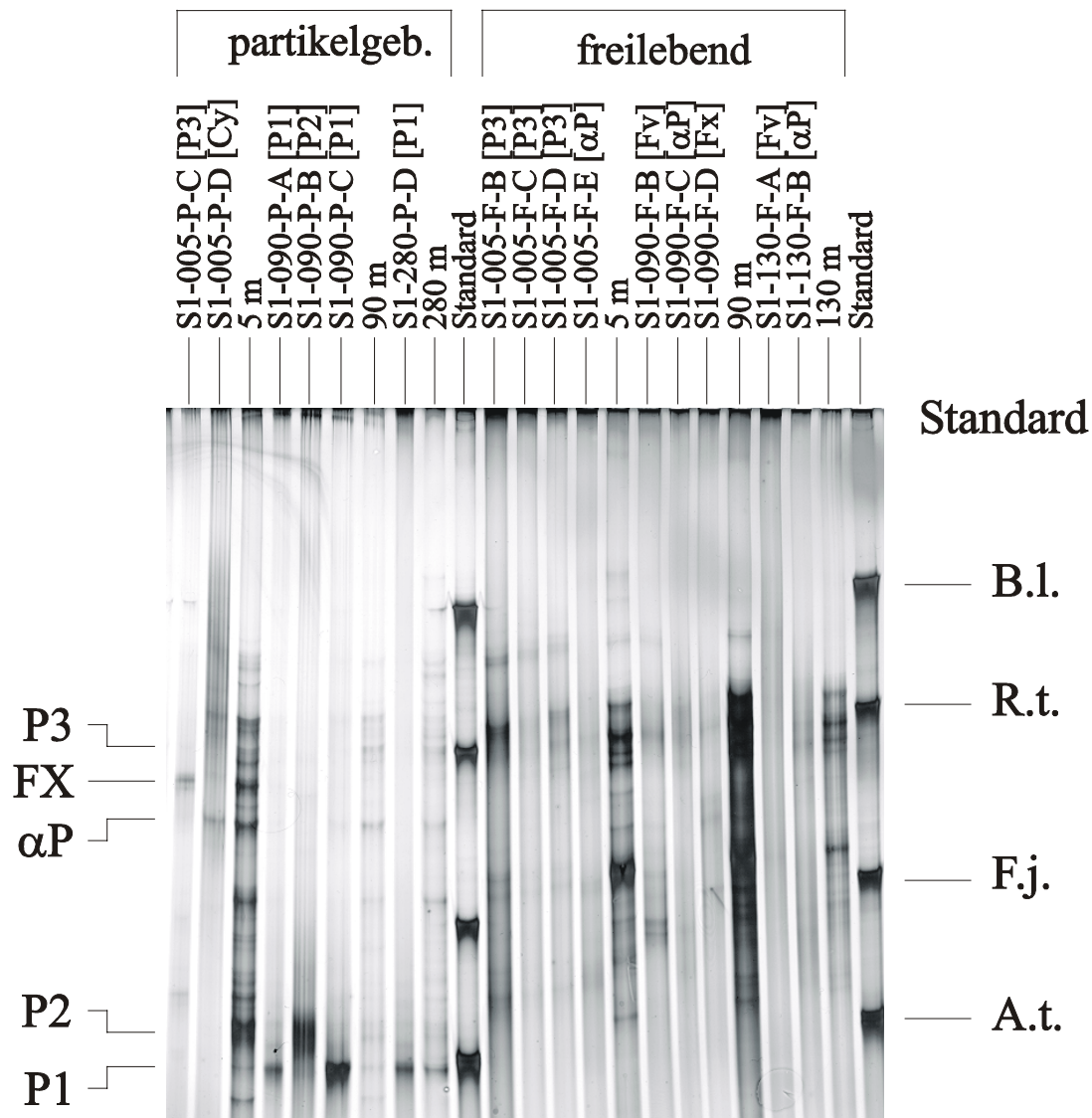


Abbildung 67: SSCP – Analyse ausgeschnittener und reamplifizierter DGGE – Banden (siehe Abbildung 59) gegen Umweltproben. DNA aus ausgeschnittenen DGGE – Banden wurden mit SSCP – Primern reamplifiziert und die Positionen der Reamplifikate gegen amplifizierte Umwelt – DNA bestimmt. Abkürzungen: P1, Plastidengruppe 1 (*Bacillariophyceae*); P2, Plastidengruppe 2 (*Haptophyceae*); P3 Plastidengruppe 3 (*Prasinophyceae*); αP, α - Proteobakterien; FX, Flexibacter. Weitere Abkürzungen siehe Abbildung 62. Weitere Einzelheiten siehe Text. Densitometrische Kurven ausgewählter Gelscans siehe Abbildung 68.

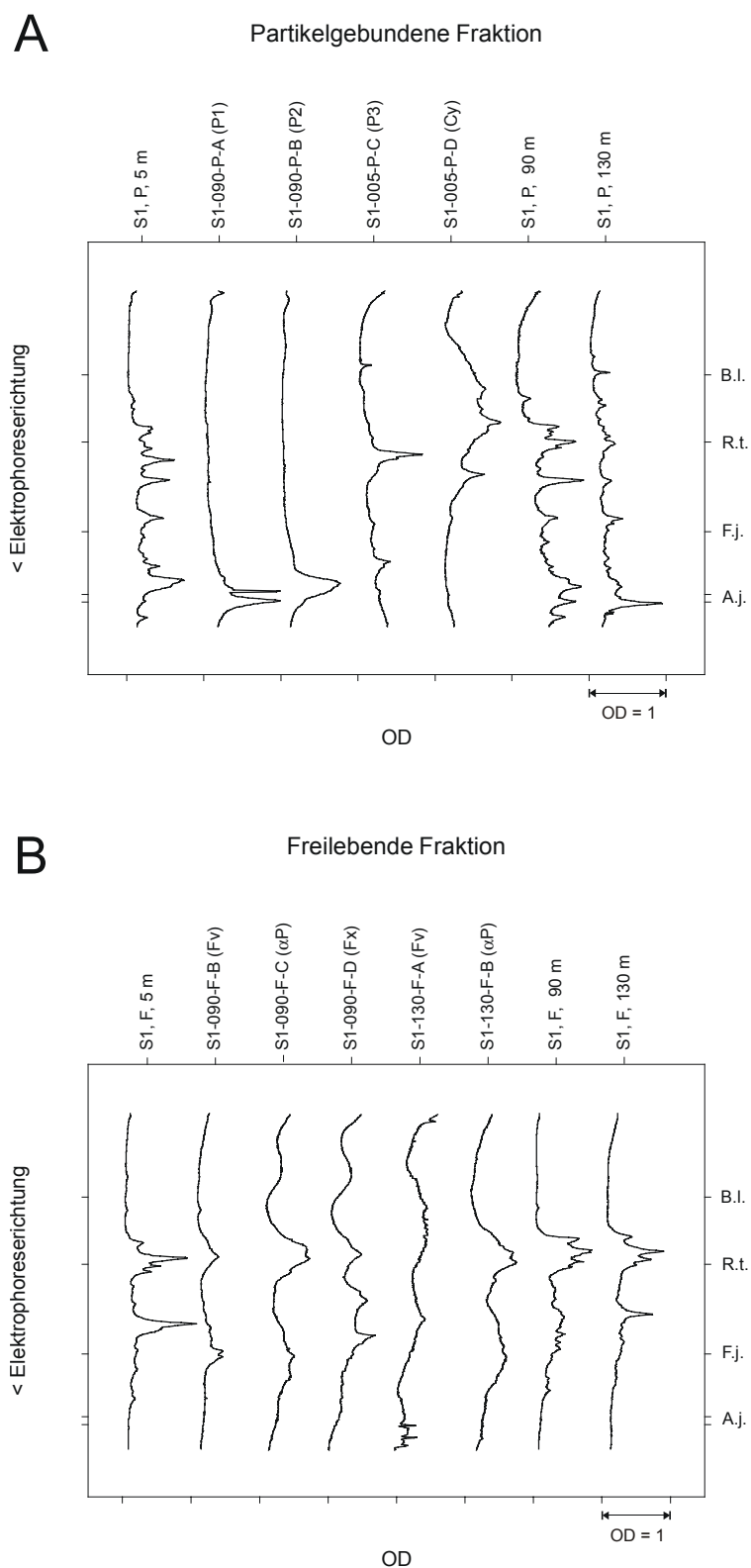


Abbildung 68: Densitometrische Kurven ausgewählter Gelscans von den in Abbildung 67 dargestellten SSCP – Profilen ausgeschnittener und reamplifizierter Banden sowie Umweltproben. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 67.

### 3.2.11 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Analysen von Umweltnucleinsäuren

In diesem Abschnitt wurden die Abundanzen bakterieller Taxa *in situ* durch RNA – und DNA – Analysen untersucht. Dabei wurde angenommen, daß der RNA – Gehalt proportional zu den der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen und damit proportional zu bakterieller Produktion ist, während der DNA – Gehalt ein Maß für die Zellzahlen betreffender Organismengruppen im Ökosystem darstellt (Fuhrman *et al.*, 1994). Folglich reflektierte die Untersuchungen mittels niedermolekularen RNA – Profilen von Umwelt – RNA die Diversität und den Anteil stoffwechselaktiver Zellen im Ökosystem, während durch DGGE – und SSCP – Analysen tendenziell die Diversität auf Basis der im Ökosystem vorhandenen Zellzahlen, unabhängig vom unmittelbaren trophischen Status der Zellen erfaßt wurde.

Die Vermessung der DNA – und RNA – Konzentrationen in den Umweltproben zeigte, daß sich der DNA – und RNA – Gehalt in den Umweltproben sowie die Nucleinsäurekonzentrationen je Zelle im Rahmen bereits publizierter Werte für marine Systeme bewegten. Lediglich im oberflächennahen Wasser (5 m Tiefe) wurden in zwei Proben der partikelgebundenen Fraktion (03.04.1995, S2 und 06.04.1995, S1) und einer Probe der freilebenden Fraktion (08.04.1995) zum Teil exorbitant hohe RNA – Konzentrationen gemessen. Unklar blieb, ob diese hohen Werte einen tatsächlich hohen RNA – Gehalt reflektierten oder ob in den Nucleinsäureextrakten aus dem oberflächennahen Wasserkörper Substanzen vorhanden waren, die mit den zur Vermessung verwendeten Farbstoffen interagierten. In der Regel betrugen die RNA – Konzentrationen sowohl in den Umweltproben als auch umgerechnet auf den Nucleinsäuregehalt je Zelle ein mehrfaches der entsprechenden DNA – Konzentrationen. Sowohl die DNA – und RNA – Konzentrationen in den Proben beider Fraktionen als auch der DNA – und RNA – Gehalt je Zelle nahm mit zunehmender Tiefe ab, ein Hinweis auf sinkende Zellzahlen und allgemein niedrigere Stoffwechselaktivität mit zunehmender Tiefe. Das Verhältnis der RNA – zu den DNA – Konzentrationen als Indikator sinkender Stoffwechselleistung pro Zelle zeigte jedoch in beiden Fraktionen nur eine geringe Tendenz zur Abnahme mit zunehmender Wassertiefe. Dies kann ein Hinweis auf eine sukzessive Aktivität physiologisch unterschiedlicher mikrobieller Taxa in verschiedenen Wassertiefen interpretiert werden, da ansonsten mit der Abnahme der Substratkonzentration während des Sinkprozesses eine Verringerung des RNA / DNA – Verhältnisses zu erwarten gewesen wäre. Diese Beobachtung waren konsistent mit der Annahme der Bildung frischer, nährstoffreicher Partikel an der Wasseroberfläche, dem mikrobiellen Abbau während des Prozesses des Absinkens und damit verbunden, einer Spezialisierung mikrobieller Fraktionen auf Ressourcen, die von den Vorgängerpopulationen auf der Wanderung des Partikels durch die Wassersäule übriggelassen oder ausgeschieden wurden.

5S rRNA – Profil - Analysen zeigten, daß zum Zeitpunkt der Probennahme nur wenige abundante Taxa im Ökosystem vorhanden waren. Lediglich zwei bis acht Banden einer für 5S rRNAs typischen Größe zwischen 130 nt und 106 nt wurden in dem Probenmaterial

gefunden. Das Vorhandensein lediglich weniger, deutlich ausgeprägter tRNA – Banden im Probenmaterial bestätigte den Eindruck, daß zum Zeitpunkt der Probennahme nur wenige Taxa einen großen Teil der Stoffwechselleistungen bestritten und dadurch einen hohen Anteil der RNA in dem Probenmaterial stellten. Grundlegende erkennbare Tendenzen aus den 5S rRNA – Profilanalysen waren:

- Die Diversität war im oberflächennahen Wasser am höchsten und nahm mit zunehmender Tiefe ab.
- Partikelgebundene und freilebende bakterielle Fraktionen unterschieden sich grundlegend.
- Die Diversität der partikelgebundenen Fraktion war geringer als diejenige der freilebenden Fraktion. In der partikelgebundenen Fraktion vereinigten oft ein bis zwei Banden den größten Teil der gesamten spurinternen OD von 5S rRNAs auf sich, während Banden der freilebenden Fraktion deutlich öfter eine gleichmäßigere Verteilung hinsichtlich der OD abundanter Banden aufwiesen.

Diese Tendenzen wurden durch Analyse der DNA aus Umweltproben durch DGGE – und SSCP - Analysen bestätigt. DGGE – und SSCP - Analysen bestätigten die Annahmen zu grundsätzlichen Unterschieden zwischen partikelgebundenen und freilebenden bakteriellen Fraktionen und zu der mit zunehmender Tiefe ständig sinkenden Diversität (die Bandenanzahl nahm mit zunehmender Tiefe offensichtlich ab). Quantifizierungen der Diversität freilebender und partikelgebundener mikrobieller Fraktionen durch Auszählen von Banden in SSCP – bzw. DGGE - Gelen scheiterten leider an dem schlecht reproduzierbaren „Scoring“, der Erkennung individueller Banden innerhalb der Gelspuren (siehe hierzu auch Burr und Pepper (1997)).

Es konnte gezeigt werden, daß ein großer Anteil der abundanten kultivierbaren OTUs mittels DGGE – bzw. SSCP – Analysen im Ökosystem nicht nachweisbar waren, mithin *in situ* nicht abundant waren. Eine Sequenzierung ausgeschnittener DGGE – Banden zeigte, daß aus der partikelgebundenen Fraktion bevorzugt 16S rRNA – Genfragmente von Plastiden einzelliger, eukaryotischer Algen erhalten wurden, während in der freilebenden Fraktion Genfragmente von  $\alpha$  - Proteobakterien und Flavobakterien, nicht aber von  $\gamma$  - Proteobakterien gefunden wurden. Hingegen wiesen im mittels SSCP – Analyse durchgeführten Vergleich zwischen den 16S rRNA - Genfragmenten kultivierbarer OTUs mit dem Bandenmuster aus Umweltproben lediglich Banden von  $\gamma$  - Proteobakterien hinsichtlich des Laufverhaltens in den SSCP – Gelen Ähnlichkeiten auf. Waren die betreffenden kultivierbaren  $\gamma$  - Proteobakterien also zum Zeitpunkt der Probennahme im Ökosystem abundant ? Das Fehlen von  $\gamma$  - proteobakteriellen Sequenzen bei ausgeschnittenen und reamplifizierten Banden kann ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei den Übereinstimmungen im Laufverhalten der Genfragmente in der SSCP – Analyse lediglich um zufällige Übereinstimmungen handelte, daß also die auf gleicher Höhe laufenden Banden der Genfragmente kultivierbarer OTUs und die Banden aus Umwelt –

DNA von verschiedenen Organismen stammten. Letztlich war kein klarer Nachweis über eine *in situ* Abundanz von Vertretern kultivierbarer OTUs vorhanden.

DGGE – und SSCP – Analysen zeigten klare Unterschiede zwischen freilebenden und partikelgebundenen mikrobiellen Fraktionen auf. Die Bandenmuster der partikelgebundenen Fraktionen unterschieden sich in einem variablen Teil in nahezu jeder Tiefenstufe, wiesen jedoch einen – offensichtlich aus Plastiden einzelliger Algen gebildeten – konstanten Anteil auf. Hingegen war das Bandenmuster der freilebenden Fraktion mit Ausnahme der Proben aus 5 m Wassertiefe relativ gleichförmig und unterschied sich nicht in verschiedenen Tiefenstufen und zwischen verschiedenen Stationen. Offensichtlich besaß der freilebende Anteil der bakteriellen Lebensgemeinschaften eine relativ stabile Zusammensetzung, während der bakterielle Partikelanwuchs einer höheren Sukzession unterschiedlicher mikrobieller Taxa unterlag. Im sehr oberflächennahen Wasser (Wassertiefe 5 m) wiesen an beiden Stationen die partikelgebundenen und freilebenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften einige gemeinsame Banden auf. Außerdem zeigten die Bandenmuster der Wasserproben aus 5 m Tiefe im Vergleich zu den restlichen Bandenmustern der jeweiligen Fraktionen einige Unterschiede. Das kann als Hinweis darauf verstanden werden, daß an der Wasseroberfläche, einem wichtigen Bildungsort mariner Partikel, die freilebenden und partikelgebundenen mikrobiellen Biozönosen noch nicht ausdifferenziert waren und sich erst mit zunehmender Wassertiefe distinkte freilebende und partikelgebundene mikrobielle Lebensgemeinschaften auszubilden begannen.

Im folgenden Abschnitt sollen die erhaltenen Ergebnisse einer kritischen Diskussion unterzogen werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Fragestellung

Im Rahmen des EMPS – Projektes wurden Anfang April 1995 nahe Nizza Wasserproben aus dem freien Wasserkörper zweier mariner Stationen, der küstennahen Station S1 und der küstenfernen Station S2 während mehrerer Probennahmetage entnommen und von mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet. Untersuchungsgegenstände waren: 1) die räumliche und zeitliche Verteilung von Mikroorganismen, 2) Messung von Stoffwechselaktivitäten, 3) Raten mikrobieller Abbauprozesse und Messung exoenzymatischer Aktivität, 4) die taxonomische Struktur und Biodiversität sowie 5) die Synthese der Ergebnisse, um computergestützte Modelle über mikrobielle Aktivitäten in marinen Umgebungen zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit hat die Biodiversität des untersuchten Probenmaterials zum Gegenstand. Die Untersuchung der Biodiversität wurde in dieser Untersuchung mit kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Methoden durchgeführt. Beide Ansätze führten, wie im Ergebnisteil dargestellt, zu unterschiedlichen Resultaten. In der Diskussion werden abschließend die Ergebnisse reflektiert und folgende Punkte genauer erörtert:

- Die verwendeten Methoden sollen diskutiert und kritisch beleuchtet werden, um aus den erhaltenen Ergebnissen gültige und sinnvolle Schlüsse ziehen zu können.
- Die Ergebnisse sollen in Zusammenhang mit den von anderen Gruppen erhaltenen Daten gestellt werden. In diesem Zusammenhang sind die von einem Kooperationspartner des EMPS – Projektes, Dr. R. Christen, anhand einer aus dem betreffenden Probenmaterial erstellten 16S rRNA Klonbank erhobenen Daten (Ruimy *et al.*, 1997) von besonderem Interesse.
- Schließlich sollen Aussagen über die taxonomischen Strukturen getroffen werden, die durch kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige Ansätze erfaßt wurden und einen Vergleich der mikrobiellen Lebensgemeinschaften zwischen den verschiedenen Fraktionen, Stationen und Isolationsmedien durchgeführt werden.

### 4.2 Untersuchung der Taxonomie der Isolate mit molekularbiologischen Methoden

Zunächst sollen die kultivierungsabhängigen Ansätze zur Charakterisierung mariner mikrobieller Lebensgemeinschaften diskutiert werden. Diese Ansätze umfaßten Isolierung einzelner Bakterienstämme aus Umweltproben sowie deren Identifizierung mit Hilfe von LMW-RNA Profilanalyse und 16S rRNA – Gensequenzierung. Eine Diskussion zu folgenden Fragen wird in diesem Abschnitt durchgeführt:

- Die LMW-RNA Analytik und 16S rRNA Gensequenzanalyse werden diskutiert und Möglichkeiten und Grenzen der Methoden aufgezeigt werden (siehe *in extenso* für LMW-

RNA Profile Abschnitt 4.2.3.; eine ausführliche Diskussion zur Sequenzierung von 16S rRNA - Genen und anderen Markergenen findet sich in (Ludwig *et al.*, 1998))

- Ergebnisse dieser beiden Methoden werden anhand des untersuchten Probenmaterials verglichen.
- Erstellung und Handhabung der computergestützten Datenbank werden erläutert.
- Erhaltene 16S rRNA – Gensequenzen werden mit Referenzsequenzen aus Datenbanken verglichen und die Ergebnisse diskutiert.
- Die 16S rRNA – Gensequenzen werden mit den partiellen 16S rRNA Gensequenzen aus Dr. Richard Christens Klonbank sowie mit den Sequenzen, die in vorliegender Untersuchung aus ausgeschnittenen DGGE – Banden erhalten wurden, verglichen und Rückschlüsse auf eine Abundanz isolierter Organismen im Ökosystem werden gezogen.

## **4.2.1 Methodik der computergestützten Auswertung von LMW-RNA-Profilen**

Ausgangspunkt der Arbeit mit marinen Isolaten waren 227 Kulturen, die aus Meerwasserproben isoliert wurden. Diese Isolate waren mit Hilfe der LMW – RNA – Profiltechnik zu charakterisieren und zu gruppieren. Als Problem erwies sich im Laufe der Untersuchungen die geringe Reproduzierbarkeit der RNA – Profile im Vergleich zwischen Proben, die auf verschiedenen Gelen gelaufen waren, gerade in Beziehung auf eine computergestützte Auswertung der erhaltenen Bandenmuster. Ursachen für die geringe Reproduzierbarkeit, Möglichkeiten und Grenzen beim Einsatz dieser Technik werden weiter unten (Absatz 4.2.2 und 4.2.3) diskutiert. Aus diesem Grund und wegen der unterschiedlichen taxonomischen Bedeutung der einzelnen Bandenklassen, nämlich 5S rRNA, Klasse II – und Klasse I tRNAs, konnten herkömmliche, zur Clusteranalyse verwendete Algorithmen zum Vergleich der RNA – Profil Bandenmuster und damit einer weitgehenden computergestützten Identifikation nicht angewendet werden. Das hatte zur Folge, daß eine Identifikation via LMW – RNA – Profile nur über einen manuellen Vergleich jedes Bandenmusters mit jedem Bandenmuster erfolgen mußte – eine Aufgabe, zu deren Bewältigung der Aufwand mit steigender Anzahl der zu betrachtenden Stämme überproportional steigt. Die eingeschlagene Taktik bei der Gruppierung der Stämme und dem Aufbau einer computergestützten Datenbank bestand darin, die Anzahl der Vergleiche dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, indem die LMW – RNA Profile nach empirisch bestimmten Kriterien vorzusortieren und den notwendigen Vergleich jedes mit jedem Bandenmuster nur noch innerhalb der so definierten Kategorien durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde eine hierarchisch organisierte Datenbank aufgebaut. Die Suchprozedur sowie Aufbau und Verwendungsweise dieser Datenbank wurde *in extenso* im Ergebnisteil dargestellt. Auf diese Weise wurden die untersuchten Stämme unterteilt in 29 OTUs und 32 „Einzelisolate“ mit LMW – RNA – Profilen, die keiner OTU zugerechnet werden konnten. Nach Überprüfung der Gruppierung durch 16S rRNA Sequenzierung wurden bei den „Einzelisolaten“ weitere 5 OTUs definiert, die mittels LMW – RNA – Profilen nicht zugeordnet werden konnten, weil die Qualität der Profile betreffender Isolate keine eindeutige Gruppierung zuließen. Somit entstanden abschließend 34 OTUs, die aus mindestens zwei Stämmen gebildet wurden sowie 22 „Einzelisolate“. Die OTUs, die

aufgrund als identisch betrachteter LMW – RNA Profile definiert wurden, sind mit Buchstaben bezeichnet worden (OTUs A ... Z), OTUs, die in Ergänzung hierzu nach der Regel „maximal 2 % Sequenzunterschied“ definiert wurden, sind zur eindeutigen Unterscheidung mit Zahlen bezeichnet worden (OTUs 1 ... 5).

Die LMW – RNA – Profildatenbank, die im Verlaufe dieser Arbeit etabliert wurde, ist sowohl als computergestützte Datenbank als auch als traditionelle, papierbasierte Datenbank umgesetzt worden. Ein Hauptaugenmerk wurde darauf gelegt, daß der Zugriff auf die RNA – Profildaten nach überprüfbaren, nachvollziehbaren Kriterien möglichst schnell und auch von unerfahrenen Anwendern vollzogen werden kann. Für die Papier – Datenbank wurde als Zugriffsform der Bestimmungsschlüssel ausgewählt, von der Überlegung ausgehend, daß die Identifizierung und Einordnung neuer RNA – Profile die Hauptanwendung einer solchen Datenbank ist und deswegen Bandengrößen, sortiert nach dem oben dargestellten Regelwerk, das Hauptzugriffsmerkmal auf Profile dieser Datenbank darstellen. Anhand des sogenannten Schlüssels, durch den jeder LMW – RNA Profiltyp datenbankintern eindeutig gekennzeichnet ist, ist jederzeit eindeutig nachvollziehbar, auf welchem Weg ein Profil in die Datenbank eingeordnet wurde. Damit wird ein Höchstmaß an Transparenz gewährleistet, z.B. für verschiedene Forscher, die am Aufbau derselben Datenbank beteiligt sind.

Der Zugriff auf die hierarchisch aufgebaute, relationale Datenbank erfolgt in der computergestützten Implementation mit standardisierten SQL (Standard Query Language) – Befehlen. Damit ist erstmals seit Einführung der LMW – RNA - Profil Methode eine computergestützte RNA – Profil - Datenbanksuche etabliert worden. Kriterien, anhand denen eine sinnvolle Gruppierung von LMW – RNA – Profilen möglich ist, wurden im Abschnitt 3.1.3.1.1 vorgestellt. Diese Kriterien basieren im Wesentlichen auf empirischen Beobachtungen, bei denen Änderungen im Bandenmuster der LMW – RNA Profile mit den taxonomischen Positionen der betrachteten Stämme verglichen wurden ((Höfle, 1998), (Höfle & Brettar, 1996) sowie dort zitierte Referenzen), wurden aber im Rahmen dieser Arbeit modifiziert, erweitert und als Regelwerk präzisiert. Als Datenbasis für dieses Regelwerk dient aus dieser Arbeit der Vergleich von 134 Stämmen mediterraner Isolate, welche sowohl durch LMW – RNA – Profile als auch durch 16S – Sequenzierung charakterisiert worden sind, sowie zusätzlich die LMW – RNA – Profile von 85 Referenzstämmen beschriebener bakterieller Spezies mit bekannten taxonomischen Positionen, so daß sich für die untersuchten Taxa, die zu der Alpha – und Gamma – Unterklasse der Proteobakterien, den *Actinobacteria*, dem Genus *Bacillus*, dem *Flavobacterium* – *Bacteroides* – Phylum sowie den charakterisierten Hefen für dieses Regelwerk ein solides Datenfundament legen läßt.

Die in Abschnitt 3.1.3.1.1 vorgestellten Suchkriterien können als Grundlage zur Evaluation für computergestützte Suchroutinen für Datenbankprogramme dienen, mit dessen Hilfe sich das Katalogisieren, die Durchmusterung der Datenbanken sowie die computergestützte Identifikation wesentlich erleichtern ließen. Solche, noch zu implementierende Routinen müssen allerdings mit der methodisch bedingten Einschränkung zurechtkommen, daß die ermittelte Größe jeder einzelnen Bande – ungeachtet der Positionen aller anderen Banden dieses Profils - eines LMW RNA – Profiles Laufunterschiede um  $\pm 1$  nt im Vergleich zum

Molekulargewichtsstandard aufweisen kann. Das bedeutet in der praktischen Umsetzung, daß ein Suchalgorithmus rekursiv nicht nur alle Ebenen, Kategorien und Fragen der jeweiligen Position abprüfen muß, sondern auch aller um  $\pm 1$  nt unterschiedlichen Ebenen, Kategorien und Fragen. Dieser Einschränkung unterliegt selbstverständlich auch jeder, der die Datenbank „manuell“, bzw. mit Hilfe von SQL – Befehlen durchforsten will: Alle Banden mit Größen von 120 nt innerhalb der Datenbank werden nur erkannt, wenn man Banden einer Größe von 119 bis 121 nt sucht – um den Preis, daß man dann auch Banden einer Größe von 119 und 121 nt im Suchergebnis findet und ggf. eine weitere Präzisierung der Suche notwendig wird. Weitere Arbeiten bei der Evaluation von LMW – RNA - Profildatenbanken müssen also der Etablierung eindeutiger, charakteristischer Suchkriterien und der systematischen Suche nach Merkmalskombinationen dienen, welche letztlich eine Wanderung auf dem schmalen Grat zwischen den beiden drohenden Gefahren, dem Einschluß falscher Positiver und dem Ausschluß richtiger Negativer in das Suchergebnis, ermöglichen. Noch eine kleine Anmerkung: Im Hinblick auf das Erkennen identischer LMW – RNA Profilmuster scheint derzeit das menschliche Auge immer noch das beste Instrument zu sein.

## **4.2.2 Vergleich der LMW-RNA Profile und der 16S rRNA - Gensequenzen**

Die Einordnung von Isolaten in OTUs nach LMW - RNA – Analysen führte zu Ergebnissen, die konsistent mit den durch 16S rRNA Sequenzierung erhaltenen Resultaten waren. Beide Methoden ergänzten sich gut hinsichtlich ihrer Auflösung: Taxonomische Analysen aufgrund von 16S rRNA - Gensequenzen besitzen eine obere Auflösungsgrenze von 97 % Sequenzidentität (siehe hierzu (Ludwig *et al.*, 1998)). Die in dieser Untersuchung durchgeführten LMW – RNA Profilanalysen zeigten, daß Stämme mit als identisch erachteten LMW – RNA Profilen in der Regel hinsichtlich ihrer 16S rRNA - Gene eine Sequenzidentität von mehr als 97 % besaßen. Somit war es möglich und zulässig, die Daten aus LMW – RNA Analysen mit den Resultaten von Studien, die auf 16S rRNA – Genanalysen basieren, zu vergleichen. Damit bestand auch eine fundierte Basis für einen entsprechenden Vergleich der Isolate mit einer 16S rRNA – Genbank, die im Rahmen des EMPS – Projektes zum selben Zeitraum an den gleichen Probennahmestellen erstellt wurde (Ruimy *et al.*, 1997). Um eine zu den LMW – RNA Analysen konsistente Unterteilung dieser Klonbank in OTUs vorzunehmen, wurden, abweichend zu der von Ruimy *et. al.* (1997) vorgenommenen Aufgliederung in OTUs, in dieser Klonbank, definiert, daß alle durch ihre 16S rRNA Gensequenzen repräsentierten Organismen, die zu mehr als 98 % identisch zu einer Sequenz dieser Klonbank waren, zu einer OTU zusammengefaßt wurden. Weiteres hierzu siehe Abschnitt 4.2.4.3.

Interessant ist es aber auch zu betrachten, wo es Unterschiede zwischen den Resultaten der LMW – RNA Analyse und der 16S rRNA Gensequenzierung gab. Zwei Klassen von Unterschieden sind denkbar:

- (1) Stämme mit als identisch betrachteten LMW – RNA Profilen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer 16S – Sequenz (Um den Einfluß von Sequenzierfehlern auszuschließen,

sollen als unterschiedlich hinsichtlich der 16S Sequenz lediglich alle zu einer LMW – RNA OTU gehörigen Stämme mit Sequenzunterschieden von mehr als 2 % gelten – eine konservative Annahme).

- (2) Stämme mit nicht als identisch betrachteten LMW – RNA – Profilen stimmen hinsichtlich ihrer 16S rRNA – Gensequenz mit einer Genauigkeit von < 2 % Sequenzunterschieden im überein.

Unterschiede der Klasse (1) wurden im Rahmen dieser Untersuchung nicht beobachtet. Dagegen trat fünfmal ein Unterschied der Klasse (2) auf, demzufolge das Ergebnis dahingehend korrigiert werden mußte, daß 10 als „Einzelisolate“ gekennzeichnete Stämme zu fünf OTUs mit je zwei Mitgliedern zusammengefaßt wurden. Diese fünf OTUs wurden mit den Ziffern 1 bis 5 bezeichnet, um in der Nomenklatur deutlich zu machen, daß die betreffenden Stämme aufgrund von partieller Sequenzierung des 16S rRNA – Genes (*E. coli* homologe Positionen ca. 500 – ca. 1000) zu OTUs zusammengefaßt wurden, gegenüber den mit Buchstaben bezeichneten, durch LMW – RNA – Profile definierten OTUs. Somit mußte das vorläufige Ergebnis nach LMW – RNA – Analyse, nach dem sich die Stämme auf 29 OTUs und 32 „Einzelläufeln“ nach 16S rRNA Sequenzanalyse zu 34 OTUs und 22 „Einzelläufeln“ korrigiert werden. Zwar waren von den Korrekturen nur Stämme betroffen, von denen LMW – RNAs lediglich niedriger Qualität isoliert werden konnten, z.B. gram – positive Stämme oder langsam wachsende Isolate mit niedrigen Ausbeuten bei der Zellernte und niedrigem Gehalt an ribosomalen RNAs. Aber es bestätigte sich die Annahme, daß durch LMW – RNA Vergleiche die Diversität aufgrund nicht erkannter Identitäten systematisch überschätzt werden kann, gerade beim Vorhandensein fälschlich nicht erkannter OTUs mit nur wenigen Mitgliedern.

In vorliegender Arbeit wurden 227 Umweltisolate unbekannter taxonomischer Position in einer Screeningprozedur mit Hilfe von LMW – RNA Profilen verglichen. Das ist die höchste bislang in der Literatur beschriebene Anzahl von Isolaten, die mit Hilfe dieser Technik durchmustert wurden. Es wurde im Rahmen dieser Untersuchungen deutlich, daß sich die Ergebnisse von LMW – RNA – Profilanalysen durch Unterschiede im Laufverhalten zwischen verschiedenen Gelläufen nur schwierig vergleichen lassen. Eigentlich eignet sich diese Technik weniger zur Durchführung von Screeningprozeduren als vielmehr zum Vergleich von Bakterienstämmen auf oder unterhalb des Genus – Niveaus, Stämme mit > 95 % Sequenzidentität auf 16S rRNA – Ebene also, deren taxonomische Position hinreichend bekannt ist und bei der alle zu untersuchenden Stämme auf ein und demselben Gel analysiert werden können. Um eine Konsistenz der Ergebnisse zu gewährleisten, sollte der Vergleich von RNA – Profilen immer Seite an Seite auf demselben Gel erfolgen. Der bislang in der Literatur beschriebene Einsatz von LMW – RNA Profilen erfolgte fast immer zur Klärung solcher Fragestellungen (siehe Höfle (1992a), Casamayor *et al.* (1998), Velazquez *et al.* (1998), Slade und Collins-Thompson (1991), Demezas und Bell (1995)). Ein Screening von bakteriellen Isolaten beinhaltet demgegenüber einen Vergleich von LMW – RNA – Profilen, die auf verschiedenen Gelen gelaufen sind. Da das Laufverhalten von LMW – RNA – Profilen auf verschiedenen Gelen sehr unterschiedlich ist, besteht die Gefahr, daß tatsächlich als identisch zu betrachtende LMW – RNA – Profile nicht als identisch betrachtet werden, dadurch insbesondere „kleine“ OTUs mit nur zwei oder drei Vertretern unerkannt bleiben und

die Diversität folglich systematisch überschätzt wird. Der Aufwand, der zum Vergleich jedes Bandenmusters mit jedem Bandenmuster betrieben werden muß, steigt bei dieser Methode überproportional zur Anzahl der untersuchten Stämme an. Folgerichtig wurde bisher lediglich in einer einzigen Veröffentlichung ein Screening mit Hilfe von LMW – RNA – Profilen durchgeführt: Höfle und Brettar (1996) beschrieben die Durchmusterung von 123 bakteriellen Isolaten aus der Ostsee, ein Probenvolumen, das etwa 50 % der vorliegenden Untersuchung umfaßt.

### **4.2.3 Möglichkeiten und Grenzen des Screenings von Umweltisolaten durch LMW-RNA Profile**

Worin bestehen aber die Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit von LMW – RNA – Profilen ? Um eine objektive Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen, werden im Folgenden mögliche Fehlerquellen diskutiert. Mögliche Fehlerquellen lassen sich einer dieser drei Gruppen zuordnen: Unterschiede im Laufverhalten zwischen verschiedenen Gelen, Unterschiede in verschiedenen RNA – Extrakten identischer Stämme und unterschiedlicher Interpretation der Bandenmuster. Unterschiede im Laufverhalten lassen sich auf folgende Faktoren zurückführen:

- Geringfügige Schwankungen der Pufferkonzentrationen, durch unterschiedlichen Sauerstoffgehalt der Monomer – Stammlösungen oder der physikalischen Parameter, wie z.B. Polymerisationstemperatur führen zu einem unterschiedlichen Polymerisationsverhalten der Polyacrylamidgele und damit zu Unterschieden im Laufverhalten der Fingerprints.
- Schwankungen während des Gellaufes, z.B. die Temperatur und die Stärke des elektrischen Feldes im Gel können variieren.
- Ebenso können lokale Effekte das Laufverhalten in Teilen eines Gels beeinflussen: Benachbarte Ladungsträger im Gel, z.B. starke RNA – Banden oder salzhaltige RNA – Extrakte mit einer hohen Ionenkonzentration können lokal dazu führen, daß die elektrische Kraft auf eine größere Anzahl elektrischer Ladungsträger wirkt und somit die Kraft, die auf den einzelnen Ladungsträger wirkt, stark verringert wird. Das führt zu einer meßbaren Verlangsamung des Laufverhaltens einzelner RNA – Banden („Mikroheterogenitäten“).
- tRNA – Moleküle besitzen eine sehr stabile Sekundärstruktur, die im Gel trotz hoher Harnstoffkonzentrationen nicht immer vollständig denaturiert. Das hat zur Folge, daß bei dem Vergleich von RNA – Profilen verschiedener Gele durch schwankende physikalische und chemische Parameter der Grad der tRNA - Denaturierung und damit das Laufverhalten variieren kann. Die meisten DNA – basierten Fingerprint – Methoden unterliegen den Einschränkungen nicht, da hier in der Regel mit doppelsträngiger DNA gearbeitet wird, welche keine intermolekularen Sekundärstrukturen bildet.
- Nicht – Konsistenz in der Anzahl erkannter Banden kann auch durch Unterschiede in der Intensität der Silberfärbung der Gele sowie des Gelhintergrundes kommen.

Weitere Parameter können auf Unterschieden verschiedener RNA – Extrakte jeweils identischer Stämme beruhen:

- Bei der RNA – Extraktion kann es zu einer partiellen Hydrolyse der extrahierten RNA kommen. Die Hydrolyse hat zwei Artefakte zur Folge: Zum einen entstehen zusätzliche RNA – Banden im Profilmuster, denen keine tRNAs im zellulären tRNA – Pool entsprechen; zum anderen wird die Intensität anderer Banden – der tRNAs, die partiell hydrolysiert wurden - vermindert. Der Grad der partiellen Hydrolyse kann variieren. PCR – basierte Fingerprint – Methoden sind von dieser Einschränkung nicht betroffen, da hier die PCR – Amplifikation aus bereits extrahierter DNA erfolgt. Allerdings können in PCR – basierten Fingerprintmethoden andere Artefakte wie Dimer – oder Chimärenbildung auftreten (siehe hierzu Abschnitt 4.3.5).
- Möglicherweise können, hervorgerufen durch unterschiedliche physiologische Bedingungen, Schwankungen des zellulären tRNA – Pools auftreten. Das würde dazu führen, daß ein definierter Stamm nicht ein charakteristisches, sondern mehrere verschiedene LMW – RNA Profile besitzen könnte, je nach Anzuchtbedingungen. Beschrieben wurden solche Effekte von Höfle (1990b) und Demezas und Bell (1995), siehe hierzu allerdings auch Henner und Steinberg (1979). Es läßt sich nicht allgemeingültig beweisen, daß der zelluläre tRNA – Pool einer jeden bakteriellen Spezies in allen physiologischen Situationen konstant bleibt.

Schließlich spielen bei der Auswertung auch noch unterschiedliche Interpretationen der erhaltenen Bandenmuster eine Rolle.

- Zunächst ist fraglich, welche Banden der LMW – RNA Profile in die Auswertung einbezogen werden sollen. Idealerweise enthalten RNA – Extrakte aus unterschiedlichen Präparationen alle RNAs in gleichen Anteilen. Durch – bei einigen Stämmen offensichtlich nicht zu vermeidende - partielle Hydrolyse treten in RNA – Profilen aus unterschiedlichen Extrakten evtl. zusätzliche Banden auf. Die Frage, welche Banden nun in eine Auswertung mit einbezogen werden sollen und welche nicht, ist interpretationsabhängig und erschwert einen Vergleich von LMW - RNA Profilen anhand ihrer Bandenmuster.
- Weiterhin spielt auch die Reproduzierbarkeit der Auswertung eine Rolle. Zur Zeit ergibt die computergestützte Erkennung von Bandenmustern in Gelen nur unbefriedigende Resultate. Die Definition von Banden im Gel muss also manuell erfolgen. Aber selbst identische Bandenmuster werden von unterschiedlichen Individuen oft unterschiedlich interpretiert. Burr und Pepper (1997) zeigten, daß selbst bei Analysen von AP – PCR Fingerprints, einer auf Stammebene auflösenden Fingerprintmethode, die aus methodischen Gründen reproduzierbarere Ergebnisse liefert, als die LMW – RNA – Profilmethodologie (z.B. Analyse doppelsträngiger statt einzelsträngiger Nucleinsäuremoleküle, Analyse von PCR – Produkten statt Rohextrakten aus Zellen) durch zwei verschiedene Wissenschaftler eine große Variabilität hinsichtlich der Auswertungen der Bandenmuster besteht. Im Test von Burr und Pepper mußten zwei Testpersonen, erfahrene Wissenschaftler, einen Datensatz von AP – PCR Fingerprints durch Spezifikation von Banden auswerten. Dabei zeigte sich nicht nur, daß die Auswerteergebnisse zwischen den beiden Individuen zum Teil erheblich differierten und

daß identische PCR - Produkte, auf verschiedenen Gelen aufgetragen, jeweils von beiden Individuen als nicht konsistent mit den entsprechenden Produkten anderer Gele beurteilt wurden, sogar Kopien bereits ausgewerteter Gele wurden von den Testpersonen im zweiten Durchgang unterschiedlich ausgewertet. Die Bandenmuster einzelner Stämme erwiesen sich nach anschließender computergestützter Ähnlichkeitsberechnung in einigen Fällen nur als etwa 40 % identisch, was Burr und Pepper zur Frage veranlaßt, ob eine zuverlässige Identifikation von Stämmen über Fingerprint – Bandenmuster jemals erreicht werden kann.

- Weiterhin müssen Kriterien etabliert werden, ab wann zwei RNA – Profilmuster als identisch und wann als verschieden betrachtet werden. Das Problem hierbei ist die Digitalisierung analoger Information: Im streng mathematischen Sinne werden die densitometrischen Kurven zweier RNA – Profilmuster niemals vollkommen identisch sein, selbst wenn das Material für diese beiden Analysen einem einzigen Stamm entstammt, aus derselben RNA – Präparation entnommen wurde und beide Analysen Seite an Seite auf demselben Gel vorgenommen werden. Es ist nicht bekannt, welcher Prozentsatz an Ähnlichkeit zur Differenzierung eines Stammes, einer Spezies oder einer OTU erwartet wird. Folglich stellt die Zuordnung von Isolaten zu OTUs immer eine willkürliche, schwierig zu objektivierende Interpretation der Ergebnisse dar. Dieses Problem läßt sich beispielsweise dadurch umgehen, daß eine Auswertung ausschließlich auf dem Vorhandensein bzw. dem Nichtvorhandensein von Banden aufbaut und die in den Bandenintensitäten enthaltenen Informationen nicht berücksichtigt werden.

Fraglich ist, in welchem Rahmen LMW – RNA – Profile zum Screening und zur Identifikation von Isolaten eingesetzt werden können. Ein zuverlässiger Vergleich der LMW – RNA – Profile zweier Stämme setzt voraus, daß die Extrakte zumindest auf dem selben Gel aufgetragen werden, idealerweise Seite an Seite. Für ein Screening - Verfahren bedeutet das, daß jeder Stamm wenigstens zweimal einer LMW – RNA – Analyse unterzogen werden muß, einem Screening – Schritt, um die verschiedenen auftretenden Bandenmuster zu katalogisieren und einem vergleichenden Schritt, um Isolate mit ähnlichen Bandenmustern Seite an Seite zu vergleichen. Angesichts der Aufwendigkeit der RNA – Extraktion, der Polyacrylamid – Gel – Analyse und der computergestützten Auswertung der Bandenmuster kann dieses Verfahren nach heutigen Maßstäben allerdings kaum mehr als schnelle Methode bezeichnet werden, denn selbst eine partielle Sequenzierung der 16S rRNA ist, angesichts massiver Verbesserungen der Sequenzierungstechnologie und der computergestützten Auswertung innerhalb der letzten zehn Jahre, ähnlich aufwendig, ähnlich teuer, dabei aber genauer in der Digitalisierung und zuverlässiger in der Interpretation der Ergebnisse, mit dem Vorteil, erhaltene 16S RNA Sequenzen mit mehr als zehntausend Referenzsequenzen kultivierbarer und nicht kultivierbarer Mikroorganismen in internationalen Datenbanken vergleichen zu können.

Es wird deutlich, daß sich die LMW – RNA Profilanalyse als Screeningmethode allenfalls für eine kleine Anzahl von Stämmen eignet und daß das Screening mit zunehmender Anzahl der zu untersuchenden Stämme schwieriger wird, weniger, weil Stämme mit unterschiedlichen Bandenmustern als ähnlich klassifiziert werden, sondern weil oft Stämme mit weitgehend



identischen Bandenmustern, da sie nicht auf ein und demselben Gel analysiert werden, nicht als zu einer OTU zugehörig identifiziert werden, die Biodiversität folglich systematisch überschätzt wird. Für welche Fragestellungen eignen sich dann LMW – RNA – Profilanalysen von Bakterienstämmen? Ein interessanter Anwendungsbereich ist der chemotaxonomische Vergleich von Stämmen, deren nahe Verwandtschaft bereits durch andere Methoden evaluiert wurde (z.B. 16S rRNA – Gensequenzidentität > 95 %), so daß sich RNA – Banden einer bestimmten Größe und einer bestimmten Intensität homologisieren lassen.

#### **4.2.4 Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen von Isolaten mit Sequenzen der Genbank**

Ein Vergleich der 16S rRNA Gensequenzen erlaubte die Einordnung der Isolate in bestehende taxonomische Gruppen. Die Ähnlichkeiten der Sequenzen im Vergleich zu Referenzsequenzen der Genbank betrug zwischen 90 % und nahezu 100 %. Ein großer Teil der LMW – RNA OTUs konnte nach Sequenzierung der 16S rRNA Gene bis auf Genusebene zugeordnet werden, allerdings repräsentierte ein großer Teil der Isolate innerhalb dieser Genera möglicherweise neue Spezies. Dieser Befund wurde sowohl durch 16S rRNA Sequenzierung als auch durch LMW – RNA Profilanalyse gestützt. Lediglich in vier Fällen wurden LMW – RNA Profile von Isolaten als identisch mit dem Bandenmuster eines Referenzstammes erachtet: OTU H' mit *Brevundimonas vesicularis* LMG 2350T, OTU H' mit *Brevundimonas subvibrioides*, OTU W mit *Deleya aquamarina* und OTU O mit einem als *Rhodotorula sp.* identifizierten Isolat namens PR (Maas, 1997).

##### **4.2.4.1 Referenzstämme**

###### **4.2.4.1.1 Alpha – Proteobakterien**

###### **4.2.4.1.1.1 *Erythrobacter* / *Sphingomonas***

Die OTU A bildete eine eigenständige taxonomische Gruppe, die, der 16S rRNA – Gensequenz zufolge, dem Genus *Erythrobacter* am nächsten stand. Die Zellen von OTU A waren allerdings leuchtend gelb pigmentiert (V4.BS.06 besitzt trotz nahezu identischer 16S rRNA – Sequenz und als identisch zu betrachtetem LMW – RNA Profil ein dunkelbraunes Pigment), während der Genus *Erythrobacter* leuchtend rote Pigmente aufwies. Die gelbe Pigmentierung deutete allerdings auf eine Verbindung zum ebenfalls nahe verwandten Genus *Sphingomonas* hin. Aus dieser Gruppe war *Sphingomonas yanoikuyae* hinsichtlich der 16 S Sequenz der OTU A am ähnlichsten. Weiterhin wies das LMW – RNA – Profil des Typstammes von *Erythrobacter longus* im Vergleich zu OTU A deutliche Unterschiede in den entscheidenden Bandenpositionen des 23S rRNA Fragmentes und der 5S rRNA auf. Ein *Sphingomonas yanoikuyae* - Stamm, JCM 7371, besaß im Vergleich mit OTU A hingegen ein als identisch zu betrachtendes LMW – RNA – Profil.

#### 4.2.4.1.1.2 *Brevundimonas*

Isolate aus der *Caulobacter* – Verwandtschaftsgruppe konnten in ihrer Mehrzahl drei OTUs , H, H' und H\* zugeordnet werden, die zu dem Genus *Brevundimonas* verwandt waren. Das Isolat V4.BO.09 stand der Gruppe *Caulobacter sensu stricto* nahe, deren bevorzugtes Habitat normalerweise das Süßwasser ist. Bekanntermaßen unterscheiden sich aus Süßwasser und aus marinen Habitaten isolierbare Stämme mit *Caulobacter* – ähnlicher Morphologie in phylogenetischer Hinsicht fundamental (Abraham *et al.*, 1999), so daß für marine *Caulobacter* – Stämme eine eigene Gattung *Maricaulis* geschaffen wurde. Interessant ist, daß in dieser Untersuchung keine marinen *Caulobacter* – ähnlichen - Isolate, also dem Genus *Maricaulis* zuzurechnenden Stämme gefunden wurden. Siehe auch Abschnitt 4.2.4.2.

#### 4.2.4.1.1.3 *Mycoplana*

OTU F schließlich bildet innerhalb der Alpha – Unterklasse der Proteobakterien eine eigene Gattung. Das einzige bisher beschriebene nahe verwandte Isolat, das Mangan – oxidierende Bakterium, Stamm S185-9A1 (Caspi *et al.*, 1996) ist ebenfalls mariner Herkunft. Diese OTU, die lediglich an Station 2 in 110 m Tiefe auf synthetischem Mineralsalz – Methanol Medium isoliert wurde, besitzt elektronenmikroskopischen Untersuchungen zufolge eine charakteristische unregelmäßige „pilzförmige“ Zellform, scheint Knospen zu bilden und besitzt einen an Caulobakterien erinnernden „Stiel“ unbekannter Funktion. Pilzförmige Zellen sind bislang beschrieben worden und wurden in den siebziger Jahren den neugeschaffenen Genera *Angulomicrobium* und *Labrys* zugeordnet. Ein Vergleich der 16S rRNA – Gensequenzen der Typstämme von *Labrys monarchos* und *Angulomicrobium tetraedrale* mit V4.MO.26 ergab allerdings lediglich Sequenzidentität in etwa 90 % der Positionen (Strömpl & Moore, 1999).

#### 4.2.4.1.2 Gamma – Proteobakterien

Die Mehrzahl der in dieser Untersuchung erhaltenen Isolate waren taxonomisch den  $\gamma$ -Proteobakterien zuzuordnen. Diese Taxa sind *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alteromonas*, *Deleya*, *Marinobacter*, *Methylophaga*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* und *Xanthomonas*. Marine Isolate dieser Taxa werden gewöhnlich regelmäßig erhalten, wenn man Meerwasserproben auf Agarplatten ausplattiert und einige Tage inkubiert (siehe hierzu die Kapitel zu den entsprechenden Taxa in Balows *et al.* (1992)). Dementsprechend wurden Isolate entsprechender Taxa aus marinen und estuarinen Umgebungen auf Agarplatten öfter isoliert (z.B. Bowman *et al.* (1997)), wurden aber auch an tierassoziierten marinen Standorten gefunden, z.B. Hämolymphe von Krabben (Sizemore *et al.*, 1975), aus Fischeingeweiden (MacFarlane, McLaughlin & Bullock, 1986), auf Eis gelagerten Fischen (Gennari & Tomaselli, 1988) faulendem Holz (Austin *et al.*, 1979a), sowie aus Industrieabwässern „pulp-mill waste“ (Gonzalez *et al.*, 1995) und „pharmaceutical waste“ (Grimes, Singleton & Colwell, 1984). Möglicherweise sind diese Organismen Saprophyten oder besitzen einen komplexen Lebenszyklus, der zeitweise Assoziationen mit Tieren

beinhaltet. Denkbar wäre beispielsweise, daß für einige Organismen Darmpassagen und damit verbunden der Kontakt mit hohen Nährstoffkonzentrationen eine wesentliche Rolle in einem solchen – hypothetischen – Lebenszyklus spielt. Organismen dieser Taxa erfahren durch Anreicherungen im Labor Bedingungen für eine effiziente Vermehrung. Beispielsweise gehören die meisten der von Agaki und Taga (1980) isolierten oligotrophen Bakterien den Genera *Pseudomonas*, *Vibrio* und *Acinetobacter* an, stehen also den OTUs P/S, C und K dieser Untersuchung nahe.

#### 4.2.4.1.3 Cytophaga / Flavobacterium

Flavobakterien bildeten die Mehrzahl molekularer Klone in Proben von der französischen Atlantikküste (Benlloch *et al.*, 1995). Ebenso wurden entsprechende Klone in weiteren 16S rRNA – Genbanken gefunden (Fuhrman *et al.*, 1993). Marine zelluläre Isolate (ZI) wurden auch in weiteren Untersuchungen regelmäßig gefunden (Mullins *et al.*, 1995), (Bowman *et al.*, 1997). In einer 16S-rDNA Klonbank, die aus marinen Makroaggregaten und deren mikrobiellem Aufwuchs erstellt wurde, bildeten Flavobakterien einen Anteil von ca. 18 % aller RFLP-OTUs (Rath *et al.*, 1999). Wegen der geringen Ähnlichkeit der dort isolierten Organismen zu den in dieser Untersuchung charakterisierten Isolaten (Identität der 16S rRNA – Gensequenz in der Regel niedriger als 90 %) erscheint ein Vergleich nicht als sinnvoll. Einen hohen Verwandtschaftsgrad zu isolierten Stämmen hingegen wiesen die molekularen Klone DTP1.3 und DTP 1.4 (Giuliano *et al.*, 1999) auf, die aus Probenmaterial an denselben Probennahmestellen im Mai 1996, also 1 Jahr nach der Probennahme für diese Untersuchung vorgenommen wurde.

#### 4.2.4.1.4 Actinobacteria und Firmicutes (Niedrig – G+C)

Ungewöhnlich erschien der hohe Anteil der isolierten *Actinobacteria* und *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt aus dem marinen Wasserkörper, werden als typische Habitate gram-positiver Bakterien doch oft andere Lebensräume angesehen: In der Literatur werden Bakterien, die zu den Genera *Microbacterium*, *Aureobacterium*, *Curtobacterium*, *Clavibacter* und *Agromyces* verwandt sind, als saprophytische, oft phytopathogene irregulär stäbchenförmige Zellen mit durchweg respiratorischem Stoffwechsel beschrieben (Collins, 1992). Ebenso wie beschriebene Vertreter dieser Genera wiesen die charakterisierten Isolate oft eine gelbe Pigmentierung auf. Die *Dermatophilaceae sensu stricto* enthalten Spezies, deren natürlicher Lebensraum das faulende Gewebe von Wundinfektionen sind. Durch *Dermatophilus congolensis*, den Typstamm der Gattung wird das Krankheitsbild der Dermatophilose oder Streptotrichose hervorgerufen (Stackebrandt, 1992). Andererseits wurden in zahlreichen Untersuchungen gram-positive Bakterien in marinen Umgebungen gefunden, z.B. in (Schulz *et al.*, 1991); (Mallory, Austin & Colwell, 1977), (Austin *et al.*, 1977). Zum Genus *Brevibacterium* gehörende Stämme werden beispielsweise bevorzugt von Standorten mit hohen Salzkonzentrationen isoliert (Collins, 1992).

Als bevorzugtes Habitat von *Micrococcus* – Isolaten wird zwar die Haut von Säugetieren angesehen, jedoch wurden *Micrococcus* - Stämmen auch in Assoziation mit limnischen und marinen Fischen sowie Crustaceen gefunden (Kocur, Kloos & Schleifer, 1992), (Gram, Wedell-Neergaard & Huss, 1990), (MacFarlane *et al.*, 1986). *Micrococcus* – Stämme wurden auch aus Meerwasserproben isoliert, wenn auch nur in beschränkter Anzahl (Kocur *et al.*, 1992), (Gunn *et al.*, 1982). Ebenso wurde auch das Vorkommen von *Arthrobacter* – Stämmen in Verbindung mit Fisch – oder Crustaceen – Epidermis oder anderen Meerwasserproben berichtet (Jones & Keddle, 1992). Der Genus *Arthrobacter* setzt sich aus zwei Gruppen zusammen, der *A. globiformis* / *A. citreus* – Gruppe einerseits sowie der *A. nicotianae* - Gruppe andererseits. Stämme, die zu diesem Genus gehören, zeigen einen charakteristischen Wachstumszyklus, in dessen Verlauf sich nicht nur die Morphologie der Zellen von unregelmäßiger Stäbchenform in der exponentiellen Phase zu Cocci in der stationären Phase ändert, sondern, parallel zur Änderung der Morphologie, auch ein Wechsel in der Anfärbbarkeit nach Gram von negativer zu positiver Färbung zu beobachten ist (Jones & Keddle, 1992). Ein solches Wachstumsverhalten kann zu einer Erklärung beitragen, warum im Verlaufe elektronenmikroskopischer Studien in marinen Umgebungen gram – positive Zellen selten gefunden werden.

Marine gram – positive Isolate mit Verwandtschaft zu marinen Isolatens dieser Untersuchung wurden allerdings auch in weiteren Untersuchungen gefunden: (Suzuki *et al.*, 1997) fanden in einer Vergleichsstudie zwischen marinen Isolatens und Umweltsequenzen Isolate der Genera *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Bacillus* und *Micrococcus*. *Clavibacter* und *Microbacterium* – Verwandte wurden neben weiteren *Actinobacteria* und *Firmicutes* mit niedrigem G+C – Gehalt als molekulare Klone in einer 16S rRNA Genbank von der französischen Atlantikküste erhalten (Benlloch *et al.*, 1995). Im See-Eis der Antarktis wurden gram - positive Isolate der Genera *Arthrobacter*, *Planococcus* und *Halobacillus* gefunden (Bowman *et al.*, 1997), (Junge *et al.*, 1998). Eine große Anzahl mariner gram-positiver Isolate wurde charakterisiert in (Ortigosa *et al.*, 1997). Insofern stellt die Isolierung von Stämmen dieser Genera an den Probennahmestellen keine Besonderheit dar.

#### 4.2.4.1.5 Fungi / Eukaryota

Sieben Isolate ließen sich den Eukaryoten zuordnen: OTU O mit sechs Isolatens ist zu mehr als 99,5 % identisch mit der 18S rRNA von *Rhodotorula glutinis*. Überraschend war die Isolation von *Ustilago sp.* in der marinen Umgebung. Die nächsten Verwandten sind *Ustilago maydis* und *Ustilago hordei*, bekannt als Erreger des Getreidebrandes. Kolonien mit *Ustilago* – ähnlicher Morphologie waren häufig in den Quellenplatten des oberflächennahen Wassers an der Station S2 zu finden, was auf eine gewisse Abundanz dieser Organismen zum Untersuchungszeitpunkt im oberflächennahen Wasser schließen läßt. V4.MO.03 war zum Zeitpunkt dieser Untersuchung der dritte Organismus, dessen 16S rRNA Gensequenz eine Affiliation zum Genus *Ustilago* erlaubte. Ein detailliert charakterisiertes Gruppe I Intron, das im 16S rRNA Gen von *Ustilago maydis*, aber nicht im Gen von *U. hordei* gefunden wurde (DeWachter *et al.*, 1992), konnte auch in diesem Isolat nicht nachgewiesen werden. Bei der Insertion dieses Introns in das 16S rRNA – Gen von *U. maydis* handelt es sich somit

offensichtlich um ein rezentes Ereignis. Aufgrund der nun vorliegenden 16S rRNA Gensequenz für V4.MO.03 kann nun gefolgert werden, daß der Besitz dieses Gruppe I – Introns somit für *Ustilago maydis* eine abgeleitete Merkmalsausprägung, mit anderen Worten ein apomorphes, möglicherweise stammspezifisches Merkmal *sensu* Hennig (1950) sowie Hennig (1982) darstellt.

#### **4.2.4.2 Phänotypische Charakterisierung der Isolate der Gattung *Brevundimonas***

Am Beispiel der untersuchten Stämme der Gattung *Brevundimonas* zeigte sich, daß die Ergebnisse der Analysen von LMW - RNA Profilen und 16S rRNA Genanalysen gut miteinander korrelieren. LMW - RNA Profile eignen sich für einen Vergleich von Stämmen eines Verwandtschaftsgrades unterhalb des Genus - Levels aber oberhalb der Spezies -Ebene, wenn sich einzelne (Klasse II tRNA-) Banden miteinander homologisieren lassen. Das war in diesem Fall für Stämme gegeben, deren 16S rRNA Sequenzen 96 % bis 100 % Ähnlichkeiten miteinander aufwiesen. Vergleiche der Bandenmuster der Genera *Brevundimonas* mit denjenigen ausgewählter *Caulobacter* Stämme zeigten allerdings die Grenzen der Vergleichbarkeit von LMW - RNA - Profilen: Obwohl die *Caulobacter* - Stämme zwischen 93 % und 96 % Ähnlichkeit zu den untersuchten *Brevundimonas* - Stämmen aufwiesen unterschieden sich die Klasse II - tRNA Bandenmuster zwischen den Vertretern beider Genera vollkommen und erlaubten keine Homologisierung einzelner Banden. Dementsprechend gestaltet sich auch eine Clusteranalyse zwischen Stämmen stark unterschiedlicher taxonomischer Position schwierig (siehe Abbildung 40): Eine Clusteranalyse der untersuchten Stämme erbrachte sinnvolle Ergebnisse lediglich bei Erstellung der Ähnlichkeitsmatrix mit dem Ähnlichkeitskoeffizienten nach (Pearson, 1926), verbunden mit einer Clusterung nach (Ward, 1963). Bei dieser Methode werden gesamte densitometrische Kurven miteinander verglichen. Der Koeffizient ist unabhängig von der Definition von Banden, reagiert aber empfindlich auf Störungen im Gelhintergrund. Eine Berechnung von Ähnlichkeitsmatrizen mit bandenbasierten Koeffizienten führte zu Dendrogrammen, die sich nach optischer Kontrolle nicht als konsistent erwiesen. Diese Schwierigkeiten beim Vergleich nahe miteinander verwandter Stämme, die auf ein- und demselben Gel analysiert worden waren, wiesen deutlich auf die Probleme hin, die beim Screening einer großen Anzahl taxonomisch verschiedener Stämme auf verschiedenen Gelen mit jeweils unterschiedlichem Laufverhalten hin.

Insgesamt wurden im Genus *Brevundimonas* 5 LMW-RNA-Profiltypen nachgewiesen (siehe Abbildung 39). Zwei dieser Profiltypen liegen im 16S rRNA - Dendrogramm innerhalb eines monophyletischen Clusters: Der *Brevundimonas* (Brv.) - OTU H Typ ist im *Brv. vesicularis* - Cluster lokalisiert, während der *Brv. variabilis* - Typ die beiden *Brv. diminuta* - Subtypen voneinander trennt. Der Grad der Ähnlichkeiten von 16S rRNA Gensequenzen innerhalb eines LMW-RNA Profiltyp - Clusters ist unterschiedlich: Isolate mit dem VB. OTU H - Typ und Stämme mit dem *Brv. vesicularis* - Typ weisen eine Ähnlichkeit > 99 % auf. Dagegen

sind die Vertreter der beiden *Brv. diminuta* - Subtypen lediglich zwischen 96,6 % und 98,9 % zueinander ähnlich. Ähnlichkeiten beim Vergleich beider Genera betrugen auf 16S rRNA - Gen Ebene zwischen 94 % und 100 %. Die LMW - RNA - Profile der Genera unterschieden sich lediglich in ihren Klasse II tRNAs. Die 5S rRNA und 23S rRNA Fragment - Banden zeigten zwar ebenfalls leichte Laufunterschiede, die jedoch im Rahmen der Lauftoleranz von  $\pm 1$  nt pro Bande blieben.

Alle der Gattung *Brevundimonas* zuzurechnenden mediterranen Isolate wiesen hinsichtlich der verwerteten Substrate Unterschiede zu ihren nächsten beschriebenen Verwandten auf (siehe Tabelle 17 und Tabelle 19). So wuchsen die beiden Stämme der OTU H' auf anderen Substraten als *Brv. vesicularis*, wiesen aber ein ähnliches Verwertungsspektrum wie *Brv. intermedia* auf. Die Stämme der OTU H waren untereinander hinsichtlich der verwerteten Substrate ähnlich, unterschieden sich aber deutlich von den nächsten beschriebenen Verwandten *Brv. vesicularis* und *Brv. intermedia*. Das Isolat V4.BP.05 besaß mit seinem nächsten Verwandten *Brv. subvibrioides* keine exklusive, gemeinsam verwertete Substrate, mit deren Hilfe man beide Stämme gegenüber allen anderen Stämmen abgrenzen könnte. Der Genus *Brevundimonas* erscheint hinsichtlich des Substratverwertungsspektrums sehr heterogen, lediglich  $\beta$ -Hydroxybutyrat, L-Prolin, L-Glutamat und 1-0 Methyl- $\beta$ -Glucopyranosid wird von allen Stämmen dieses Genus verwertet.

Somit lassen sich Angaben zu einem Grundbauplan von Mitgliedern dieser Gattung formulieren. Zu apomorphen Grundmerkmalen der Stämme der Gattung *Brevundimonas* gehören, nach Ergebnissen dieser Untersuchung zu schließen:

- Gap in der 16S rRNA-Sequenz (ca. 21 fehlende Nucleotide) bei nt 1256 – 1278 (*E. coli* homologe Position)
- LMW-RNA Profil mit 5 Klasse II tRNAs (wird bei den LMW - RNA - Profiltypen *Brv. vesicularis* und OTU H auf 4 Klasse II tRNAs reduziert). Immer vorhanden sind innerhalb des Genus *Brevundimonas* die Banden bei 92 und 86 nt, weiterhin gehören zur Grundausrüstung Klasse II tRNA-Banden bei 94 nt (Größe beim *Brv. vesicularis*-Typ  $\rightarrow$  96 nt) sowie 88 nt ( $\rightarrow$  87 nt bei dem *Brv. diminuta*-Typ) sowie eine weitere Klasse II tRNA Bande.
- Verwertung der Substrate  $\beta$ -Hydroxybutyrat, L-Prolin, L-Glutamat und 1-0-Methyl  $\beta$ -Glucopyranosid. Eine Verwertung dieser Substrate wurde bei allen untersuchten Vertretern dieses Genus beobachtet. Weiterhin gehören zur Grundausrüstung die Fähigkeit zur Verwertung von  $\alpha$ -D-Glucose (reduziert bei *Brv. diminuta*), Maltose (reduziert bei *Brv. diminuta* und [*Mycoplana*] *bullata*) und Glycyl-L-Glutamat (reduziert bei *Brv. intermedia*).
- Konstitutive Enzymaktivitäten von Alkalischer Phosphatase, Leucin-Arylamidase, Trypsin, Saure Phosphatase (reduziert, inaktiv oder nicht konstitutiv (red.) bei V4.BP.05), Valin-Arylamidase (red. bei *Brv. diminuta*),  $\alpha$ -Glucosidase (red. bei V4.BP.05 und *Brv. diminuta*) und Esterase-Lipase (C8) (red. bei LMG9567t1). Katalase und Oxidase sind immer vorhanden.

OTU H unterschied sich hinsichtlich der Substratverwertungsspektren deutlich sowohl vom nächsten beschriebenen Verwandten *Brv. intermedia*, als auch vom hinsichtlich der 16S rRNA Sequenz ähnlichsten Stamm, LMG 11070. LMG 11070 vermochte außerdem nicht, auf Medien mit höherer Salzkonzentration als 1 % [w/v] zu wachsen, während alle Stämme von OTU H optimales Wachstum bei 1 % bis 3 % Salzkonzentration zeigen. Die optimale Wachstumstemperatur der Stämme von OTU H lag bei 30 °C.

Am Beispiel der Differenzierung der zum Genus *Brevundimonas* zuzuordnenden OTUs H, H' und H\* konnte somit exemplarisch gezeigt werden, daß eine Identifizierung mariner Isolate anhand von LMW – RNA – Profilanalyse und 16S rRNA Gensequenzierung eine weitgehende Differenzierung nahe verwandter Organismen ermöglichte und mit einer Gruppierung aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften der klassifizierten Organismen übereinstimmende Ergebnisse lieferte. LMW – RNA Profilanalyse und 16S rRNA Gensequenzierung ergänzten sich hinsichtlich ihrer Sensitivität gut: 16S rRNA Sequenzierung liefert für die Analyse phylogenetischer Beziehungen bis zu maximal 97 % identischer Sequenzpositionen konsistente Ergebnisse mit der LMW – RNA - Profilanalyse. Oberhalb einer Sequenzidentität von 97 % ist zwar eine Differenzierung, aber keine Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen nahe verwandten Organismen mehr möglich (Ludwig *et al.*, 1998). LMW – RNA Profilanalysen waren am wirkungsvollsten, wenn verwandte Stämme verglichen werden, deren Klasse II tRNA – Banden sich in nur wenigen Positionen voneinander unterschieden. Das entsprach, den Erfahrungswerten aus dieser Untersuchung nach, einer Ähnlichkeit von mehr als 95 % bis 97 % auf 16S rRNA – Gensequenz – Ebene. Somit eignet sich die LMW – RNA Profilanalyse als Methode, welche die Sensitivitätslücke zwischen 16S rRNA – Gensequenzierung (bis 97 % Identität) und DNA – DNA – Hybridisierung (Spezies – Level bei 70 % Hybridisierung, entsprechend etwa 97 % Identität auf 16S rRNA – Gensequenz – Ebene) schließen kann.

#### **4.2.4.3 Genbank mediterraner Klone von Dr. Richard Christen**

Im Labor von Dr. Christen wurden 200 Klone durch partielle 16S rRNA Sequenzierung charakterisiert (Ruimy *et al.*, 1997). Ein paar Worte zu der von Ruimy *et al.* (1997) in ihrem unveröffentlichten Manuskript verwendeten Methodik: An den Stationen S1 und S2 wurden marine Partikel durch Filtration von ca. 500 Liter Meerwasser durch *in situ* Pumpen auf Nucleopore – Filter eines Porendurchmessers von 10 µm filtriert. Bei der Probennahme an Station S1 am 07.04.1995 wurden Proben aus 140 m, 420 m und 700 m Tiefe gezogen, am 08.04.1995 wurden Probenmaterial aus 100 m und 400 m Tiefe entnommen. Im Labor wurde das Filterretentat mit sterilen Rasierklingen vom Filter abgekratzt. Das Pellet wurde in TE – Puffer durch 10 – minütiges Vortexen mit Glaskugeln gelöst, mit Proteinase K und Natriumdodecylsulfat (SDS) – haltigem Lysis Puffer versetzt, durch dreiminütiges Vortexen lysiert und die DNA aus dem Lysat mittels Phenol – Chloroform Extraktion isoliert. Partielle 16S rRNA – Gene wurden mit Primern, homolog zu den *E. coli* Positionen 8 bis 27 (Vorwärts-Primer) und 1385 bis 1402 (reverser Primer) amplifiziert. Die PCR bestand, nach

einem einleitenden Denaturierungsschritt für 5 Minuten bei 95 °C, aus 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 45 Sekunden, einem Annealingschritt bei 53 °C für 60 Sekunden und einem Extensionsschritt bei 72 °C für 90 Sekunden. Der letzte Extensionsschritt bei 72 °C wurde auf 5 Minuten verlängert. PCR – Produkte wurden auf einem 1 % - Low Melting Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und eluiert. Eluierte PCR – Produkte wurden mit Hilfe des TA Cloning Kit (Invitrogen, England) in *E. coli* – Rezipientenzellen kloniert. Zu sequenzierende Klone wurden zufällig ausgewählt. Plasmide wurden durch Mini Preps (Sambrook *et al.*, 1989) isoliert und anschließend mit Hilfe des T7 – Sequenase – Protokolles sequenziert, wie von Ruimy *et al.* (1994) beschrieben. Der zur Sequenzierung verwendete Primer war homolog zu den *E. coli* 16S rRNA - Positionen 519 bis 536.

Die in vorliegender Untersuchung in die Sequenzvergleiche einbezogenen Sequenzen sind unter den Genbank – Accession - Nummern Z77352 bis Z77694 niedergelegt. Die Sequenzvergleiche wurden in dieser Untersuchung auf den Bereich zwischen den *E. coli* – homologen Nucleotidpositionen 240 – 436 beschränkt. Somit konnten die Sequenzen mit ungefähr 200 Nucleotidpositionen nachträglich mittels Maximum Parsimony – Methoden in bestehende Dendrogramme aus nahezu vollständigen 16S rRNA - Gensequenzen eingerechnet werden. Nahezu vollständige 16S rRNA – Gensequenzen erstreckten sich von den *E. coli* – homologen Positionen 28 bis 1524. Ebenfalls nachträglich in das Dendrogramm eingerechnete Partialsequenzen von Isolaten umfassten ungefähr die Region der *E. coli* homologen Positionen 500 – 1000. Partialsequenzen von ausgeschnittenen DGGE – Banden umfassten die Region der *E. coli* – homologen Positionen 342 – 906. Ein genauer Vergleich mit den Sequenzen von Isolaten, Referenzstämmen sowie Sequenzen eluierter DGGE – Banden findet weiter unten statt. Hier soll zunächst gezeigt werden, daß sich durch nachträgliches Einrechnen von Partialsequenzen in ein bestehendes, aus nahezu vollständigen Sequenzen berechnetes Dendrogramm zu bestehenden taxonomischen Analysen konsistente Ergebnisse erzielen lassen.

Von den 16S rRNA Gensequenzen mariner Isolate wurden Dendrogramme auf folgende Art berechnet: Um den Einfluß multipler Nucleotidsubstitutionen an einer bestimmten Position und damit verbundener Verkürzungen der evolutionären Distanzen entgegenzuwirken, wurden in die Analysen lediglich die Positionen einbezogen, an denen ein Nucleotid mit einer Abundanz von wenigstens 50 % auftrat. Distanzen wurden nach Korrektur für multiple Substitutionen mit dem Algorithmus von Jukes und Cantor (1969) berechnet. Aus den Distanzen wurden Dendrogramme mit dem Algorithmus von Fitch und Margoliash (1967) errechnet. Dendrogramme wurden nach Erstellung global rearrangiert.

Ein direkter Vergleich der Sequenzen aus der Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) mit den Sequenzen von marinen Isolaten und ausgeschnittenen DGGE – Banden war auf diese Art nicht möglich: Die Sequenzen aus Dr. Christens Klonbank überlappten nur in einem kleinen Bereich mit den Sequenzen ausgeschnittener DGGE – Banden. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob 16S rRNA Gensequenzen aus der Klonbank Ähnlichkeiten zu Sequenzen der Isolate aufweisen könnten, wurden die Partialsequenzen von ausgeschnittenen



DGGE – Banden und von Sequenzen der Klonbank nachträglich in ein existierendes Dendrogramm eingerechnet. Dieser Prozeß umfaßte drei Schritte:

- **Erstellung eines Referenzdendrogrammes:** Zunächst wurde mit nahezu vollständigen 16S rRNA Referenzsequenzen von Isolaten und Sequenzen aus der Genbank ein Dendrogramm errechnet, wie oben für marine Isolate beschrieben. Die so erhaltenen Dendrogramme nahezu vollständiger 16S rRNA – Gensequenzen werden im Folgenden als Referenzdendrogramme bezeichnet.
- **Einrechnen von Partialsequenzen:** Zu diesen Referenzdendrogrammen wurden Partialsequenzen mit den im ARB – Programmpaket implementierten Parsimony – Algorithmen hinzugerechnet, deren Position im Dendrogramm durch Einordnung zur nächst ähnlichen Referenzsequenz ermittelt und das erhaltene Dendrogramm auf Konsistenz mit dem Referenzdendrogramm überprüft. Die Positionen der im Referenzdendrogramm enthaltenen Spezies blieben bei dieser Prozedur unverändert.
- **Überprüfung der Konsistenz:** Zur Überprüfung der Konsistenz wurden zwei Vergleichsdendrogramme errechnet, wie oben für marine Isolate beschrieben. Die Dendrogramme wurden durch Vergleich der Referenzsequenzen zum einen mit den Klonbank – Sequenzen über den Bereich von bis nt (*E. coli* homologe Positionen des 16S rRNA – Gens) , zum anderen mit den ausgeschnittenen DGGE – Banden im Bereich der *E. coli* homologen Positionen 342 – 906 erhalten. Die Topologien aller Dendrogramme zeigten gute Übereinstimmungen, in keinem Fall wurden gravierende Abweichungen festgestellt.

Allerdings muß betont werden, daß bei diesem Verfahren die tatsächlichen Sequenzähnlichkeiten nicht überlappender Partialsequenzen nur annähernd beschrieben werden können. Beispielsweise werden zwei nicht überlappende Teilsequenzen eines Organismus an unterschiedlichen Stellen im Dendrogramm abgebildet. Diese Unterschiede werden um so gravierender, je unähnlicher die nächste bekannte vollständige Referenzsequenz ist, relativ zu welcher diese Partialsequenzen in das Dendrogramm eingerechnet werden.

Taxonomisch verteilen sich die Klone folgendermaßen:

Station	Tiefe [m]	Cyano- bakt. / Plastiden	Alpha – Proteo- bakt.	Gamma – Proteo- bakt.	Delta - Proteo- bakt.	Flavo- bakt.	Plancto- myces	Sonstige	Summe Station / Tiefe
<b>S1</b> <b>07.04.1995</b>	140	11	2	16	0	4	0	2	35
	420	22	5	6	2	3	8	4	50
	700	5	6	9	1	4	2	8	35
<b>S2</b> <b>08.04.1995</b>	100	9	1	14	0	8	5	0	37
	400	20	0	12	3	5	1	2	43
<b>Summe Taxa</b>		67	14	57	6	24	16	16	200

Tabelle 26: Verteilung übergeordneter taxonomischer Einheiten auf die Probennahmestelle, absolute Anzahlen.  
Abkürzung: -bakt.: -bakterien

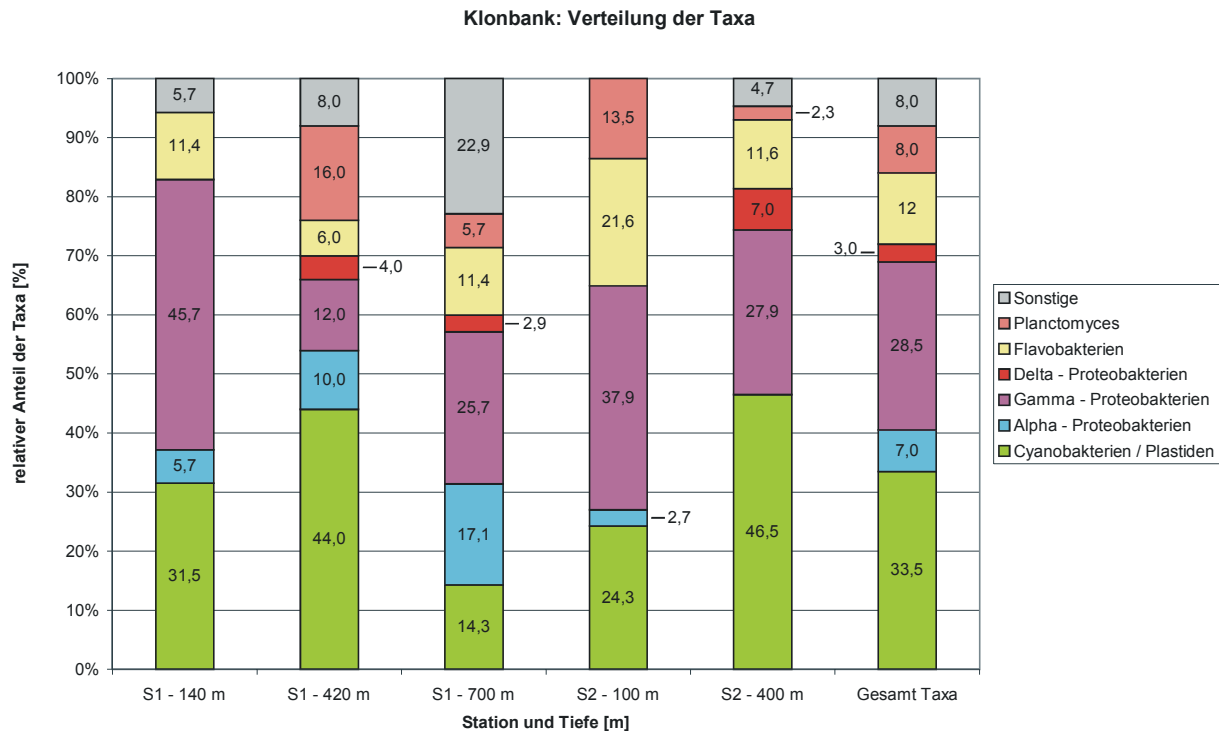


Abbildung 69: Relative Verteilung übergeordneter taxonomischer Einheiten auf die Probennahmestelle. Die Zahlenangaben im Säulendiagramm geben den prozentualen Anteil von Klonen der betreffenden taxonomischen Einheiten bezogen auf die Gesamtzahl der je Station und Tiefenstufe analysierten Klone wieder. Abkürzungen: S1, Station S1; S2, Station S2.

#### 4.2.4.4 Sequenzen aus eluierten DGGE – Banden

Aus PAA – BAC Gelen wurden Banden eluiert und insgesamt 21 eindeutige Sequenzen erhalten. Keine dieser Sequenzen entsprach einer von einem Isolat erhaltenen Sequenz. Ein direkter Vergleich der DGGE – Sequenzen mit den Sequenzen der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) war nicht möglich, weil die sequenzierten Bereiche einander nur in 50 nt überlappen. Um einen Vergleich wenigstens annähernd zu ermöglichen, wurden Dendrogramme auf folgende Art und Weise erstellt: Zunächst wurde ein „Grundgerüst“ des Dendrogrammes anhand von nahezu vollständigen 16S rRNA – Sequenzen mit einer Korrektur für multiple Substitutionen nach Jukes – Cantor und dem Fitch – Algorithmus errechnet. Diesem Grundgerüst wurden dann mittels Parsimony – Algorithmen Partialsequenzen hinzugerechnet, so daß sich die Position der Partialsequenzen relativ zu den Positionen der Vollsequenzen des Grundgerüsts ergab. In Kauf genommen werden muß, daß solcherart errechnete Bäume naturgemäß ungenauer und fehlerbehafteter sind, als auf einem Sequenzvergleich homologer Positionen basierende Dendrogramme. In Kauf genommen werden muß, daß Partialsequenzen unterschiedlicher Regionen identischer Organismen nicht immer exakt auf derselben Stelle des Dendrogrammes abgebildet werden. Jedoch erlaubt diese Methode wenigstens eine näherungsweise Übersicht über die taxonomische Position von Partialsequenzen, die sich ansonsten nicht miteinander vergleichen lassen.

#### 4.2.4.4.1 Plastiden / Cyanobakterien

Plastidäre und cyanobakterielle Sequenzen wurden relativ häufig in der Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) und in den ausgeschnittenen DGGE – Banden nachgewiesen. Diese Gruppe fehlt aber vollständig bei den Isolaten – was wenig verwundert angesichts der im Dunklen durchgeführten Inkubationsprozedur. Ein Vergleich der 16S rRNA Sequenzen zeigt, daß die DGGE – aufgetrennten Genfragmente der cyanobakteriellen (*Prochloron* – ähnlichen) Sequenz und der Sequenzen der Plastidengruppen 1 und 3 verwandt zu häufig in der Klonbank gefundenen Sequenzen waren. Die Genfragmente der *Skeletonema* – ähnlichen Plastiden stellten einen großen Teil der Sequenzen in Dr. Christens Klonbank dar und die Sequenzen der DGGE Banden gruppieren ebenfalls so nahe in diesem Ast des Dendrogrammes, daß man auf eine hohe Abundanz dieser Organismen in situ zum Zeitpunkt der Probennahme schließen konnte. Die Wahrscheinlichkeit einer präferentiellen PCR – Amplifikation dieser Sequenzen wurde minimiert durch die Tatsache, daß die Amplifikationen bei beiden Untersuchungen mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt worden waren. Klone aus dem *Skeletonema* – Cluster fanden sich in allen fünf beprobte Tiefenstufen – allerdings mit unterschiedlicher Abundanz. Von 67 Sequenzen aus dem Cyanobakterien / Plastiden – Cluster stammten 40 Sequenzen oder 20 % aller charakterisierten Sequenzen aus der *Skeletonema* – Assemblage. Bemerkenswert ist, daß von insgesamt 40 Sequenzen der Klonbank, die im *Skeletonema* – Cluster gruppieren, 16 Klone an Station S1 in 420 m Tiefe gefunden wurden und weitere 16 an S2 in 400 m Tiefe. Lediglich die Plastidengruppe 2 fand keine Entsprechung zu den in der Klonbank von Dr. Christen gefundenen Sequenzen. Das kann allerdings ein Artefakt sein, hervorgerufen durch den Mangel an Referenzsequenzen über die volle Länge des 16S rRNA Gens: Dadurch war es nicht möglich, die Sequenzen der Genfragmente relativ zu einer solchen Referenzsequenz in dem Dendrogramm zu positionieren. Beispielsweise ist nicht auszuschließen, daß die Sequenzen 2-400 C2 2.1, 2- 100 C23 und 1-140 C43 der 16S rRNA Genbank von Dr. Christen, die im Dendrogramm einen sich deutlich von den übrigen Sequenzen abhebenden monophyletischen Ast bildeten, in Wirklichkeit die Fortsetzung der DGGE – Sequenzen der Plastidengruppe 2 in 5' – Richtung darstellten, welche allerdings durch das Fehlen von Referenzsequenzen, relativ zu welchen eine Einordnung ins Dendrogramm möglich wäre, an einer anderen Stelle in das Dendrogramm eingerechnet werden. Zur Klärung dieser Frage wäre es notwendig, eine Referenzsequenz besagter Klone von Dr. Christen über die ganze Länge in die Sequenzanalyse einzusetzen.

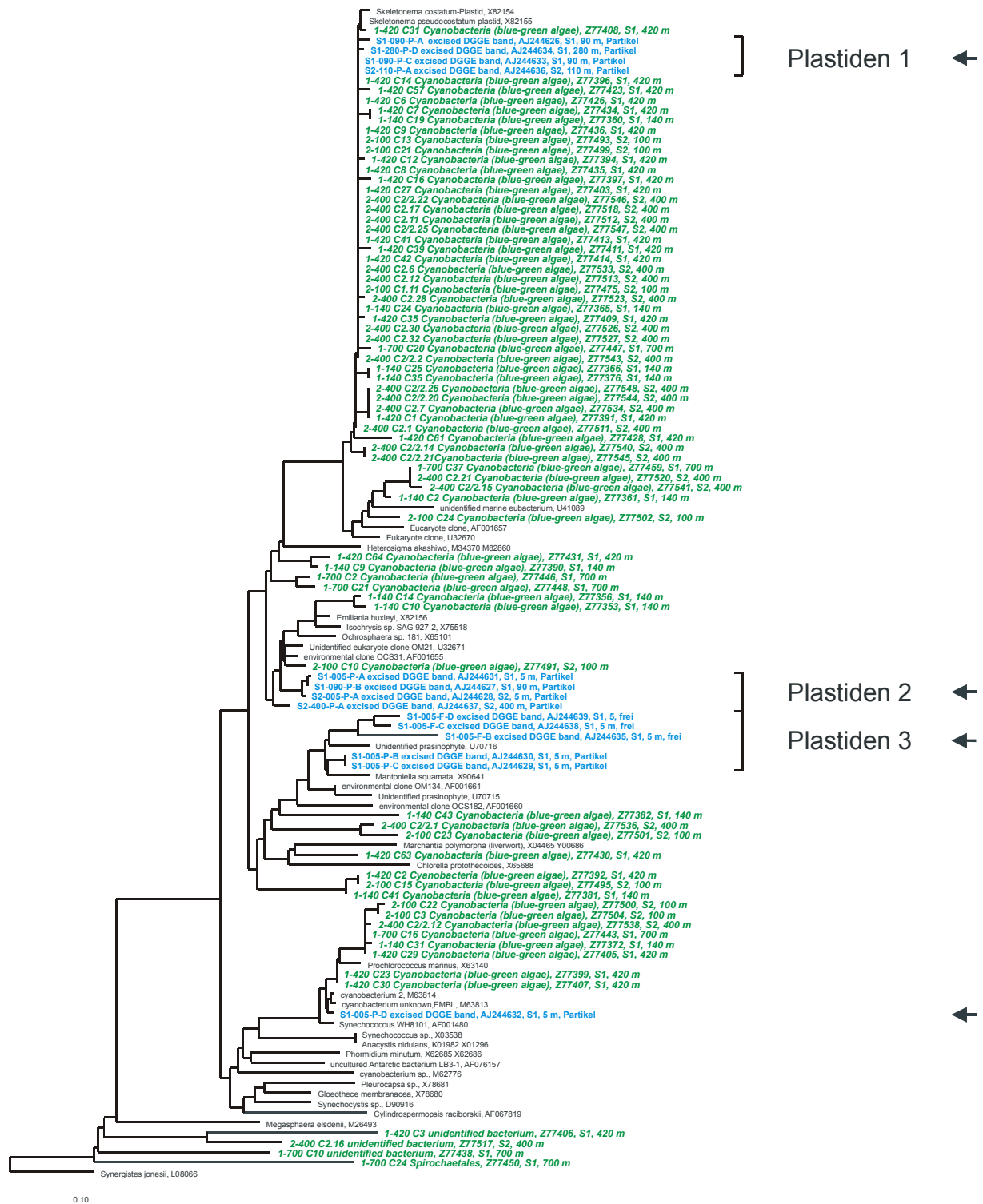


Abbildung 70: Dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen mit Affiliation zu Cyanobakterien sowie Plastiden aus ausgeschnittenen DGGE – Banden sowie aus der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Sequenzen ausgeschnittener DGGE – Banden (Positionen durch Klammern und Pfeile markiert) sind durch blaue, fett gesetzte Schrift markiert und Sequenzen aus der Klonbank von Dr. Christen sind durch grüne, fett gesetzte Schrift hervorgehoben.

#### 4.2.4.4.2 Cytophaga / Flavobakterium / Bacteroides – Phylum

Vier der aus den eluierten DGGE – Banden gewonnenen Sequenzen zeigten Ähnlichkeiten zu dem *Flavobakterium* / *Cytophaga* / *Bacteroides* – Phylum. Allerdings gruppierte lediglich eine der Sequenzen, S1-090-F-D, innerhalb dieses Phylums. Dort stand der durch diese Sequenz bezeichnete Organismus den Sequenzen der Klonbank 1-140 C6, 2-100 C1.12, 2-100 C1.9, 1-140 C39 und 1-140 C23 nahe und könnte, nach Analyse der Vollsequenzen, mit den durch diese Sequenzen repräsentierten Organismen ein Taxon bilden. Die drei anderen Sequenzen, S1-90-F-B, S1-130-F-A und S2-260-P-A, zeigten nur entfernte Verwandtschaft mit diesem Phylum, ließen sich aber auch keinem weiteren bekannten Taxon zuordnen. Wegen des Fehlens von Referenzsequenzen, relativ zu welchen eine Einordnung der Partialsequenzen in das Dendrogramm möglich gewesen wäre, erscheint der Vergleich dieser drei mittels DGGE – Elution gewonnenen Sequenzen mit den Sequenzen der Klonbank von Dr. Christen derzeit nicht möglich. Möglicherweise repräsentieren die Sequenzen der drei DGGE – Banden andere Taxa als die aus der Klonbank gewonnenen Sequenzen.

Ein Vergleich der Sequenzen zwischen Isolaten und der Klonbank zeigte, daß durch beide Methoden unterschiedliche Taxa erfaßt worden waren. Weder zu OTU V, mit sieben Isolaten die am häufigsten isolierte Flavobakterien – Spezies, noch zu OTU M wurden Klone mit ähnlichen Sequenzen gefunden. Liegt es daran, daß diese OTUs an Station S1 nicht vorkommen? Möglicherweise war das der Fall für OTU M, die ausschließlich von Partikeln vom Eingang der Bucht Villefrance s. M. isoliert wurde, nicht aber für OTU V: Mit V4.ME.09 wurde ein Isolat der OTU V aus Wasserproben von Station S1 isoliert. Das der OTU V nahestehende Taxon, welches durch das Isolat V4.BE.50 repräsentiert wird, findet ebenfalls keine Entsprechung, obwohl V4.BE.50 am Probennahmetag des Materials für die Klonbank aus 700 m Tiefe isoliert wurde, einer Tiefenstufe, die auch durch *in – situ* – Filtration beprobt wurde. Statt dessen verteilten sich die *Cytophaga* – Sequenzen weitläufig über das Dendrogramm und bildeten teilweise monophyletische Cluster, von denen sich einige Cluster erheblich von bisher bekannten Sequenzen unterscheiden (z.B.: 1-140 C7 und 2-400 C2/2.29; 1-700 C40 und 1-700 C41; 2-100 C1.5, 2-400 C2.9, 2-100 C1.14 und 2-100 C1.8). Ein Cluster von Sequenzen der Klonbank enthielt einen beschriebenen bakteriellen Stamm: Das durch die Klone 2-400 C2.23, 2-400 C2/2.11, 2-100 C1.2 und 1-420 C26 definierte Cluster enthält auch *Cytophaga lytica*.

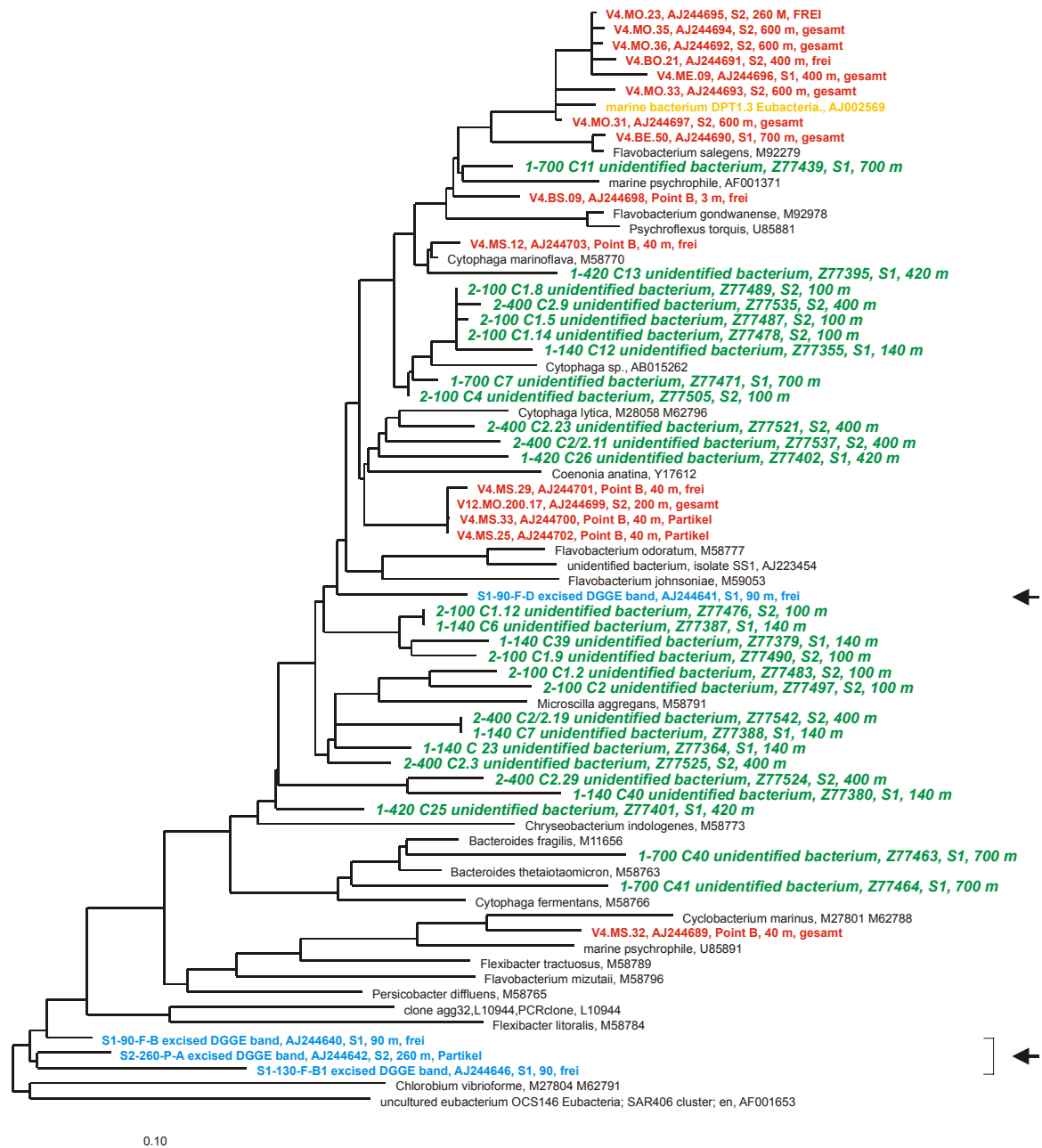


Abbildung 71: Dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen mit Affiliation zum *Bacteroides* – *Flavobakterium* - Phylum aus ausgeschnittenen DGGE – Banden sowie aus der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Sequenzen aus der Klonbank von Dr. Christen sind durch grüne, fett gesetzte Schrift hervorgehoben. Sequenzen ausgeschnittener DGGE – Banden sind blau beschriftet und deren Position ist durch einen Pfeil markiert. Sequenzen aus der Untersuchung von (Giuliano *et al.*, 1999) sind durch gelbe Schrift gekennzeichnet.

#### 4.2.4.4.3 Alpha – Proteobakterien

Drei der aus eluierten DGGE – Banden erhaltenen Sequenzen gruppierten innerhalb der Alpha – Proteobakterien. Die drei Sequenzen bilden ein eigenständiges monophyletisches Cluster mit Ähnlichkeiten zu *Rhodospirillum*. Demgegenüber zeigen 5 von insgesamt 14 der innerhalb der Alpha – Proteobakterien gruppierenden Sequenzen von Dr. Christen die höchsten Sequenzähnlichkeiten zum SAR 11 – Cluster, einem Taxon bisher unkultivierter Bakterien, das bisher nur durch Sequenzen aus 16S rRNA Genbanken bekannt ist und über das keine physiologischen Informationen erhältlich sind. Allerdings wurden alle zum SAR 11 – Cluster gehörenden Klone lediglich an Station S1, nicht an Station S2 gefunden. Es zeigte sich sogar, daß, mit Ausnahme des Klon 2-100 C19, alle Alpha – proteobakteriellen Sequenzen der Klonbank von Dr. Christen, genau wie alle aus ausgeschnittenen DGGE – Banden erhaltenen Sequenzen lediglich an Station S1, nicht aber an Station S2 gefunden wurden. Dieser Befund steht allerdings in Gegensatz zu dem Bild, das bei Betrachtung der Isolate entsteht: An Station S2 waren, wie oben dargestellt, rund 17 % aller Isolate Alpha – Proteobakterien, die sich auf 7 Taxa verteilten, während von Station S1 lediglich etwa 5 % aller Isolate, die sich auf 3 Taxa verteilten, alpha – proteobakterieller Herkunft waren. Dieser Befund erklärt sich dadurch, daß nur zwei der Sequenzen von Isolaten Ähnlichkeiten zu den aus der Klonbank erhaltenen Sequenzen zeigten, 1-420 C28 zu V4.BO.03 sowie 1-140 C22 zu V4.ME.23 und V4.BP.10 – allerdings mit jeweils nahezu 10 % unterschiedlichen Positionen. Weiterhin zeigte Klon 1-420 C65 Ähnlichkeit zu den drei aus DGGE – Banden erhaltenen Sequenzen. Berücksichtigt man, daß die Partialsequenzen nachträglich in das Dendrogramm eingerechnet wurden und unterschiedliche Bereiche des 16S rRNA - Genes repräsentierten, könnte dieser Klon dasselbe Taxon wie die drei ausgeschnittenen Gelbanden repräsentieren. Drei weitere Klone gruppierten in der Nähe von *Rickettsia*: 2-100 C19, 1-140 C16 und 1-420 C11. Keiner der in der Genbank enthaltenen Klone zeigte Ähnlichkeiten zu den Sequenzen der OTUs H, H', H\* (*Brevundimonas sp.*) oder OTU F (*Mycoplana dimorpha* – ähnlich), obwohl zumindestens im Falle von OTU H zwei Isolate von Station S1 erhalten wurden, eines davon, V4.BE.49 sogar am selben Probennahmetag (07.04.1995) in derselben Tiefe (700 m), in der auch Probenmaterial für die 16S Genbanken durch *in situ pump* – Filtration gewonnen wurde.

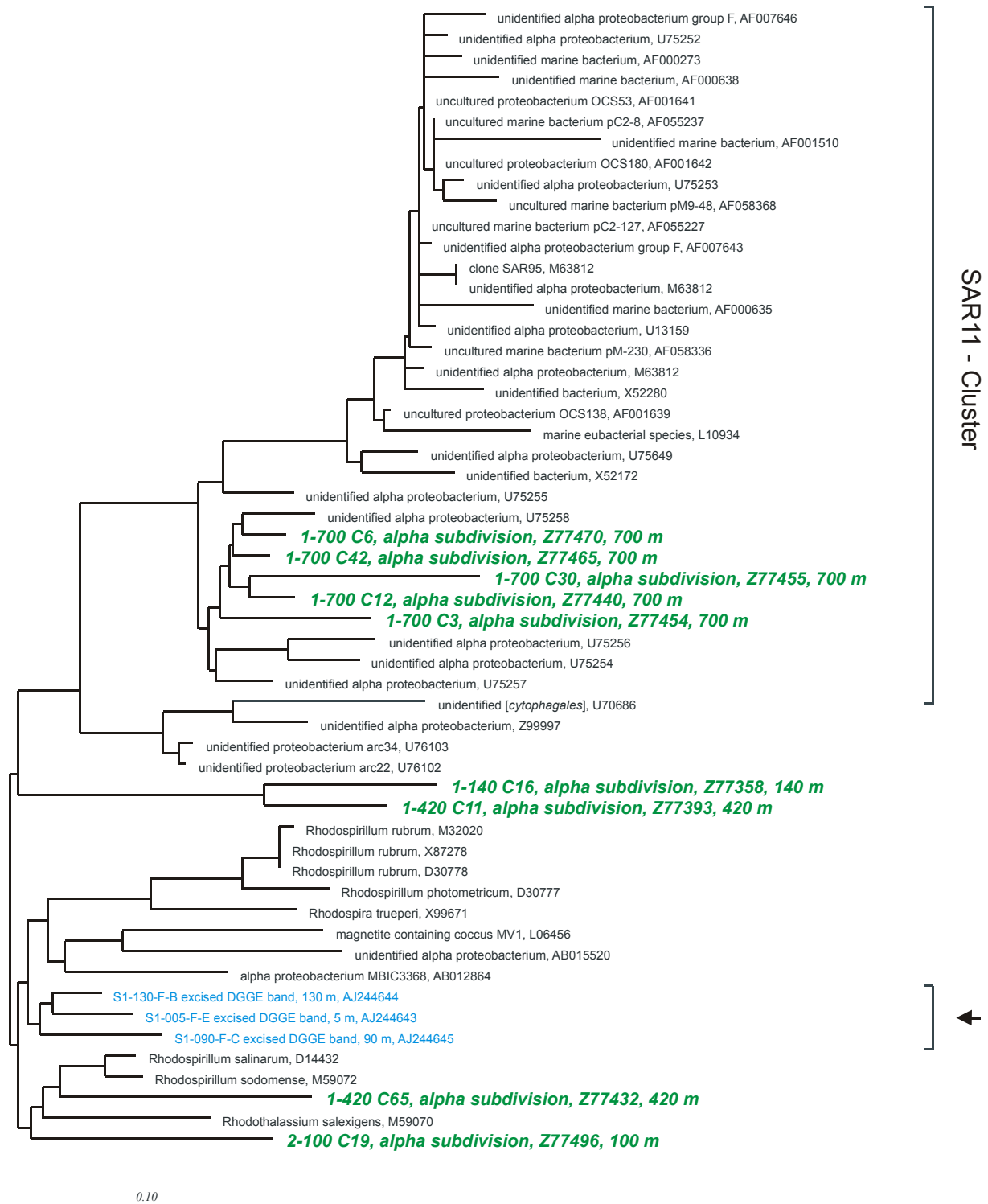


Abbildung 72: Dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen mit Affiliation zu Alpha – Proteobakterien aus ausgeschnittenen DGGE – Banden sowie aus der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 70.



#### 4.2.4.4.4 Gamma – Proteobakterien

Insgesamt 57 der 200 Klone von Dr. Christens Klonbank ließen sich den Gamma – Proteobakterien zuordnen. Somit bilden die Gamma – Proteobakterien nach den Cyanobakterien / Plastiden mit 67 Klonen die zweithäufigste taxonomische Großgruppe der Klonbank. Der relative Anteil der Gamma – Proteobakterien an der Gesamtzahl der Klone betrug 28,5 %, während der Anteil dieser Gruppe an der Gesamtzahl der Isolate 59 % betrug. Allerdings fanden sich in der Klonbank einige taxonomische Großgruppen, die aufgrund ihrer physiologischen Ansprüche in dieser Untersuchung nicht isoliert werden konnten. Wenn man die Vertreter der taxonomischen Gruppen, die nicht durch Isolate repräsentiert wurden, nicht berücksichtigt (das betrifft die Taxa Cyanobakterien / Plastiden, *Planctomyces*, Delta – Proteobakterien und die sonstigen Eubakterien), dann errechnet sich für die verbleibenden Taxa ein Anteil der Gamma – Proteobakterien von 56 % , ein Wert, der sich mit dem für Isolate ermittelten Wert sehr gut deckt. Offensichtlich ließ sich eine zahlenmäßige Dominanz der Gamma – Proteobakterien auch mit den aus der Klonbank erhaltenen Daten belegen.

Ein Vergleich der Abundanz von taxonomischen Einheiten unterhalb des Genus – Levels zeigte jedoch eine Reihe von Unterschieden zwischen Isolaten einerseits und Klonen andererseits:

- 17 Klone ließen sich dem Taxon *Vibrio* zuordnen, neben den *Skeletonema* - Plastiden sind neben der OTU innerhalb der Gattung *Vibrio* somit die einzigen Klone, die in allen fünf *In-situ-pump* Proben gefunden werden konnten. Auf eine hohe Abundanz dieses Taxons *in situ* läßt auch die Isolierung nach MPN –Verdünnung zweier Vertreter dieses Taxons schließen (Giuliano *et al.*, 1999). Isolate wurden von diesem Taxon allerdings nur in geringer Anzahl an Station 2 und an Punkt B, nicht aber an Station 1 erhalten.
- 10 Klone und 5 Isolate gruppieren mit *Alteromonas macleodii*.
- Die mit 51 Isolaten abundante Isolate – OTU B (*Pseudoalteromonas sp.*) war in der Klonbank nur mit vier Klonen repräsentiert. Alle vier Klone stammen aus Probenmaterial von Station S1.
- Von den beiden *Pseudomonas* – Taxa, die durch Isolate vertreten waren, fand sich nur das zu *Pseudomonas stutzeri*, nicht aber das zu *Pseudomonas synxantha* verwandte Taxon in der Klonbank.
- Einige Cluster der Gamma – Proteobakterien waren lediglich durch Klone, nicht aber durch Isolate repräsentiert: (1) 2-200 C20, 1-140 C5, (2) drei Klone um 2-100 C1.20, (3) ein nahestehendes Cluster zu *Alteromonas* um 1-700 C13, (4) ein Cluster mit 6 Klonen um 1-700 C32, (5) die Klone 2-100 C26 und 2-100 C2.34 und (6) das zu *Methylophaga* nahestehende Cluster mit den Klonen 1-700 C26 und 1-700 C8.
- Einige isolierte Taxa der Gamma – Proteobakterien sind in der Klonbank nicht gefunden worden. Das betraf die OTUs K, S, L, L' und W. Insbesondere OTU K (*Psychrobacter sp.*), die etwa 10 % aller Isolate stellte, war nicht in der Klonbank repräsentiert. Als Faustregel läßt sich formulieren, daß alle isolierten OTUs, deren LMW-RNA Profile 5S rRNA – Banden kleiner als 120 nt aufwiesen, nicht in der Klonbank nachgewiesen wurden.

- Es wurde kein Vertreter der Gamma – Proteobakterien aus ausgeschnittenen DGGE – Banden charakterisiert .

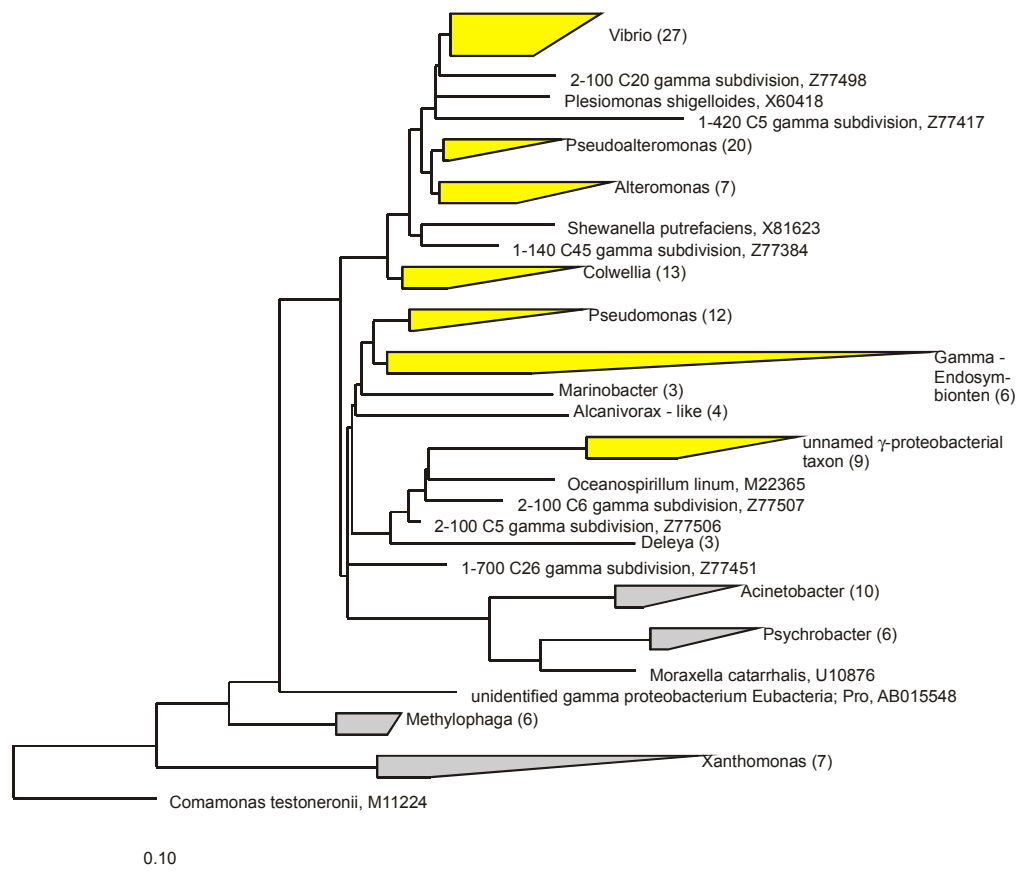


Abbildung 73: Übersichts dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen aus der Klonbank von Dr. Christen mit Affiliation zu Gamma – Proteobakterien. Die Sequenzähnlichkeiten innerhalb der in dieser Abbildung zu Gruppen zusammengefaßten Genera sind im Detail in Abbildung 74 und Abbildung 75 dargestellt. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der zu einer Gruppe zusammengefaßten Sequenzen an. Gelb markierte Gruppen enthalten Organismen, welche durch Sequenzen aus der Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) repräsentiert werden. Siehe zur detaillierten Darstellung Abbildung 74 und Abbildung 75.

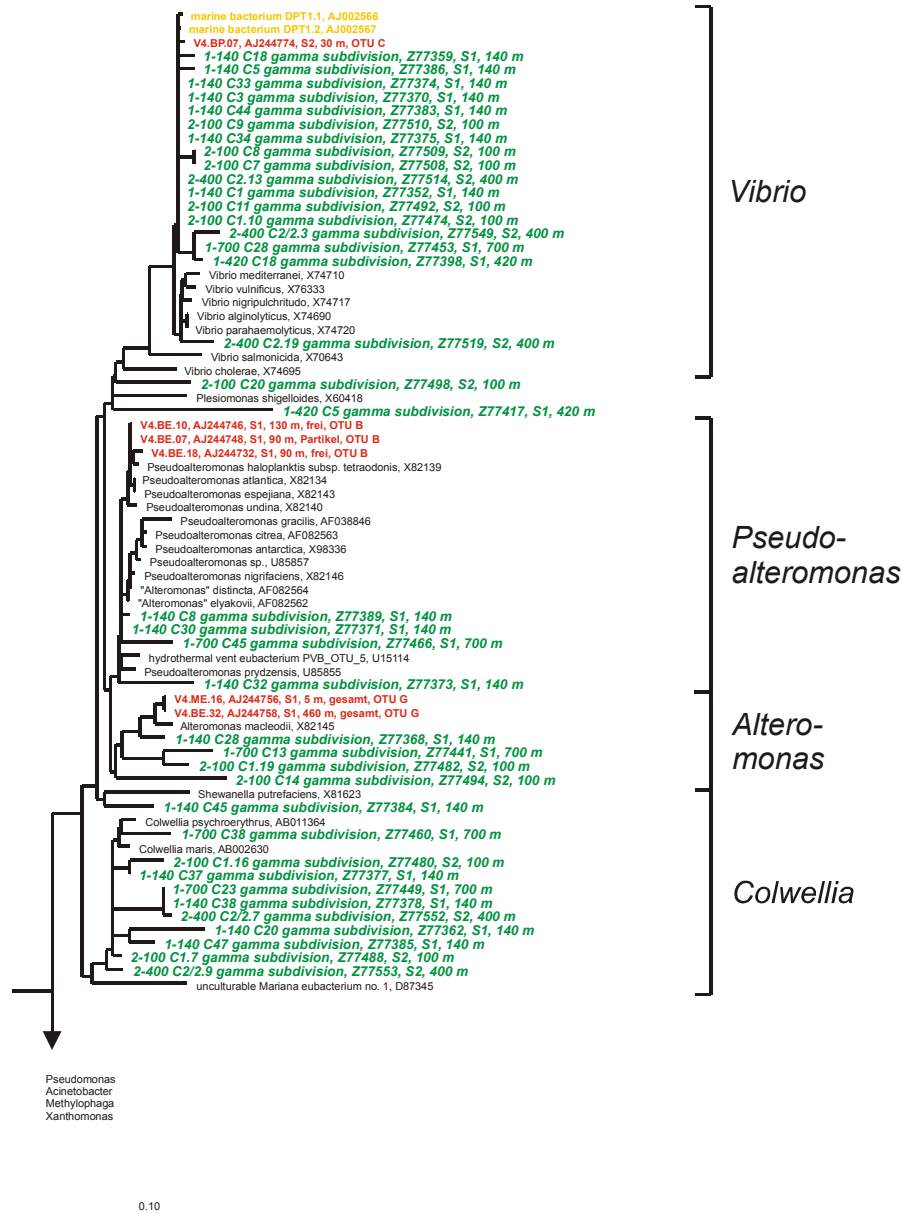


Abbildung 74: Dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen mit Affiliation zu den Genera *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* und *Colwellia* der Gamma – Proteobakterien aus der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Der Maßstab dieser Abbildung entspricht dem für Abbildung 75 gewählten Maßstab, um Vergleiche innerhalb beider Abbildungen zu erleichtern. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 70 und Abbildung 71.

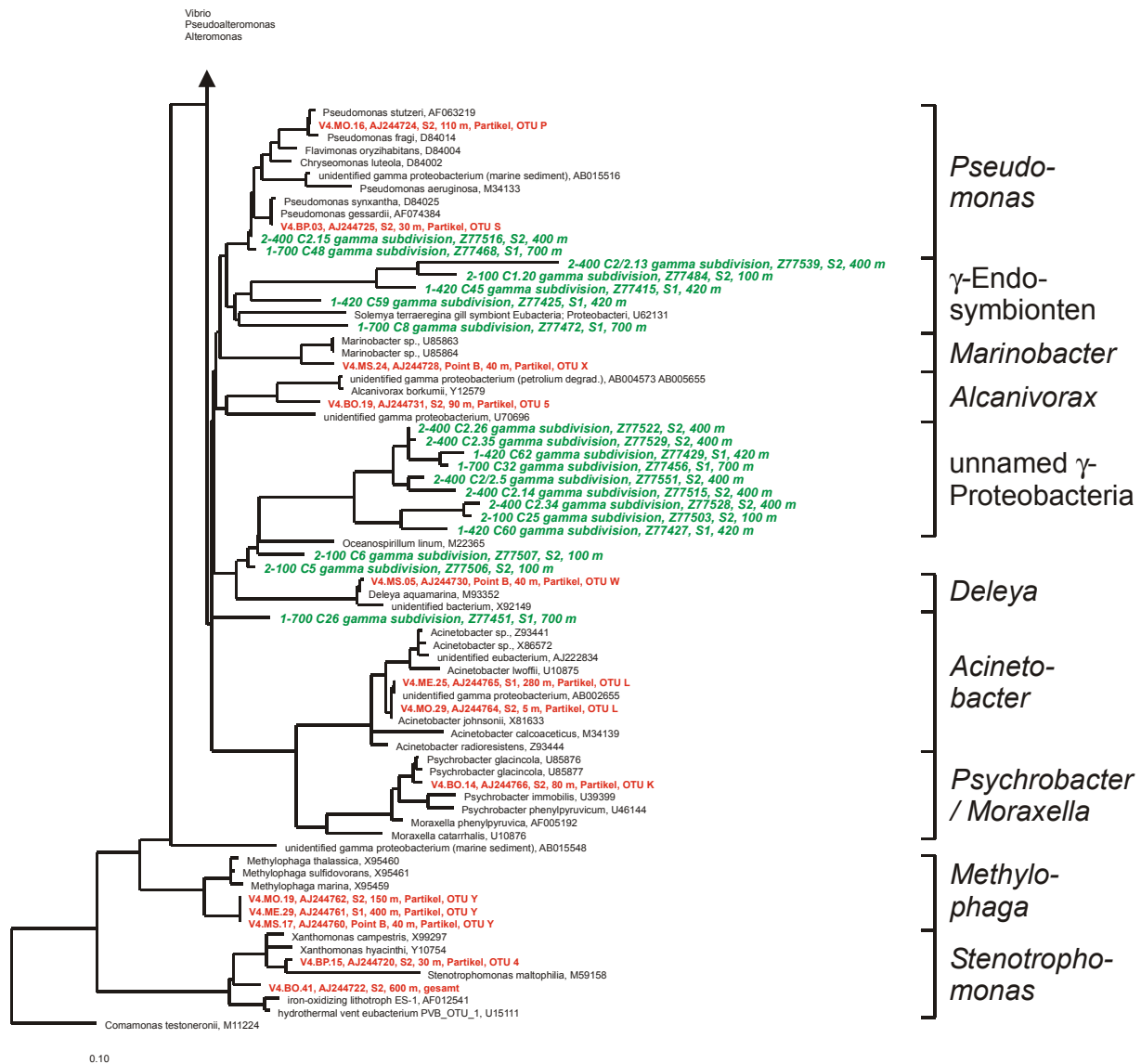


Abbildung 75: Dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen mit Affiliation zu den Genera *Pseudomonas*,  $\gamma$  - proteobakterieller Endosymbionten *Marinobacter*, *Alcanivorax*, einem unbenannten  $\gamma$  - proteobakteriellen Taxon, *Deleya*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* / *Moraxella*, *Methylophaga* und *Stenotrophomonas* der Gamma - Proteobakterien aus der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Der Maßstab dieser Abbildung entspricht dem für Abbildung 74 gewählten Maßstab, um Vergleiche innerhalb beider Abbildungen zu erleichtern. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 70.

#### 4.2.4.4.5 Planctomyces

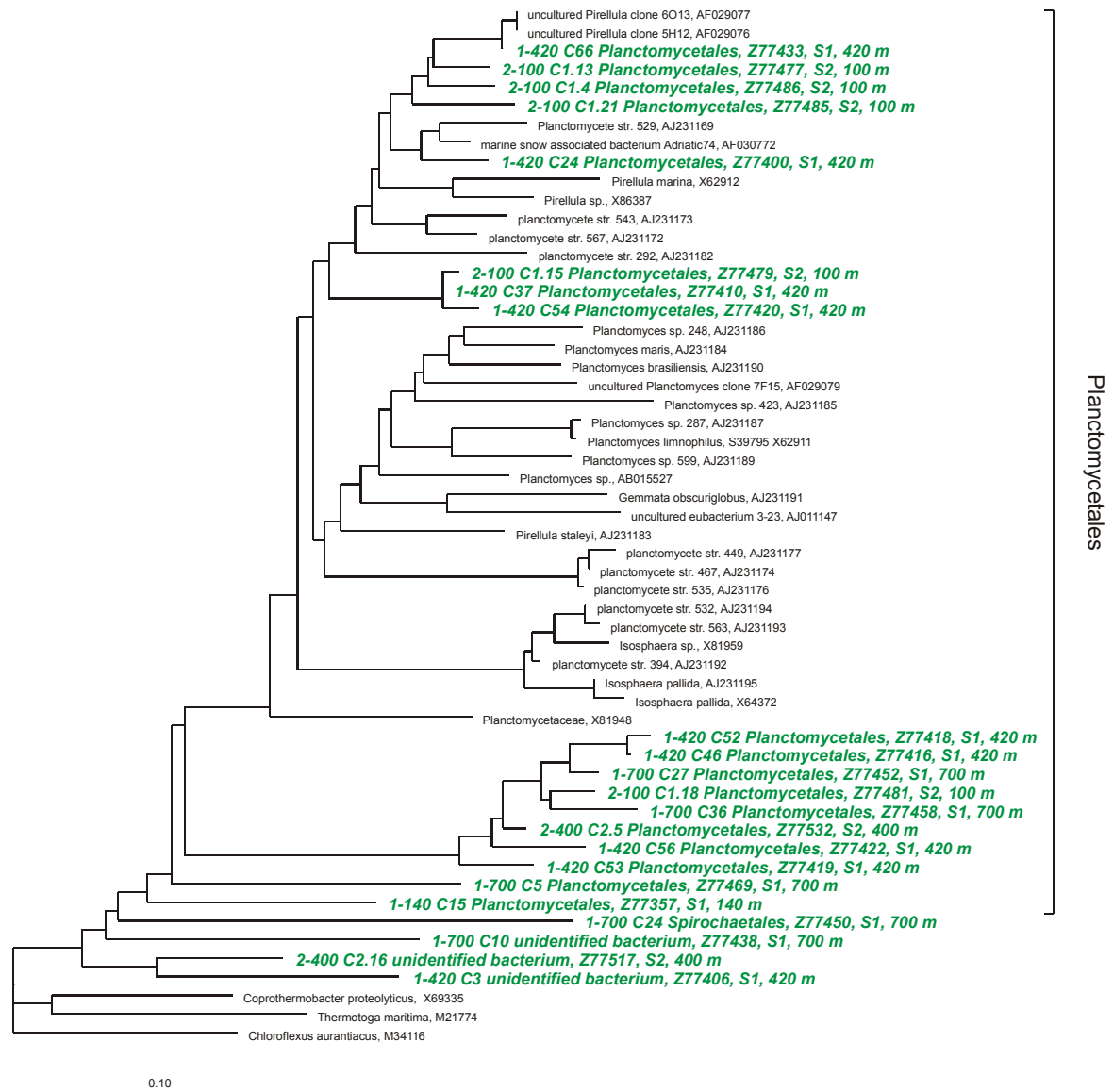


Abbildung 76: Dendrogramm der Ähnlichkeitsverhältnisse partieller 16S rRNA Gensequenzen mit Affiliation zu dem Taxon Planctomyces aus ausgeschnittenen DGGE – Banden sowie aus der Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 70.

Diese taxonomische Gruppe ist in vorliegender Untersuchung nur durch Klone, nicht aber durch Isolate und ausgeschnittene DGGE - Banden charakterisiert worden. Aufgrund der niedrigen Datendichte für dieses Taxon konnten die Klone innerhalb dieser Gruppe keinen bekannten Genera zugeordnet werden. Die Mehrzahl der Klone, die den Planctomycetales zuzurechnen sind, ließen sich einem von vier Clustern zurechnen:

- 5 Klone um 1-420 C24; dieses Cluster steht *Planctomyces limnophilus* sowie einem mit „marine snow“ assoziierten Bakterium aus der Adriatischen See nahe
  - 3 Klone um 1-420 C37
  - 8 Klone um 2-100 C1.18, die untereinander aber genügend große Unterschiede aufwiesen, um sie möglicherweise verschiedenen Arten zuordnen zu können
  - 2 Klone, 2-400 C2.16 und 1-420 C3, die sich allerdings ebenfalls deutlich voneinander unterscheiden und wohl nur wegen der geringen Datendichte in diesem Taxon ein monophyletisches Cluster bildeten.
  - Zwei Klone, die sich keinem dieser vier Cluster zuordnen ließen, 1-700 C5 und 1-140 C15
- Rückschlüsse auf phänotypische Eigenschaften dieser Organismen konnten nicht gezogen werden, da der Grad der Verwandtschaft der durch diese Sequenzen repräsentierten Organismen zu Typstämmen zu niedrig war, um Aussagen zu ermöglichen.

#### 4.2.4.4.6 Gram – Positive Bakterien

Mit einem Anteil von 20 % bildeten Gram – Positive Bakterien die zweitstärkste Fraktion der Isolate. Demgegenüber wurden keine Sequenzen aus ausgeschnittenen DGGE – Banden dieser taxonomischen Großgruppe erhalten und lediglich drei Klone der Klonbank fielen in diese Gruppe: Klon 1-700 C1 stand der *Micrococcus* / *Arthrobacter* Gruppe nahe und 1-700 C14 sowie 1-700 C39 gruppieren in der Nähe des Genus *Clostridium* (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Alle drei Sequenzen wiesen allerdings deutliche Unterschiede zu den Sequenzen von Isolatn dieser Gruppen auf und waren möglicherweise eigenen Genera zuzuordnen. Somit betrug der Anteil Gram – Positiver Bakterien an der Gesamtzahl charakterisierter Klone lediglich zwei Prozent, also 1/10 des Anteiles, den die *Actinobacteria* und *Firmicutes* (Niedrig – G+C) bei den Isolatn erzielten. Zwei mögliche Erklärungen hierfür sind, (1) eine deutlich erhöhte Kultivierbarkeit von *Actinobacteria* und *Firmicutes* mit niedrigem G+C-Gehalt aufgrund von Stressunempfindlichkeit, (2) eine verminderte Ausbeute bei der DNA – Extraktion, die der Erstellung der Genbank vorausgegangen war. Die sich im Zellaufschluss stark refraktär verhaltenden *Firmicutes* könnten hier gegenüber den leichter aufzuschließenden gram – negativen Bakterien in der Klonbank unterrepräsentiert worden sein.

## 4.2.5 Quantifizierung der Diversität

### 4.2.5.1 *Bestimmung der Coverage*

Die untersuchten Isolate, 227 an der Zahl, wurden 56 verschiedenen taxonomischen Gruppen zugeordnet, wobei 23 „Gruppen“ jeweils nur durch einen einzigen Stamm repräsentiert waren. Eine wichtige Frage ist, wie repräsentativ dieser Datensatz im Vergleich zu einer hypothetischen, unendlich großen Isolatesammlung ist. Die Größe des Ausschnittes einer Isolatesammlung unendlicher Größe, der durch die untersuchten Isolate abgedeckt wird, kann berechnet werden. Dieser Wert wurde von Good (1953) als „Coverage“ bezeichnet und ergibt sich aus folgender Formel:

$$C = 1 - (n_1 / N)$$

Definiert sind hier  $n_1$  als Anzahl aller Isolate, die lediglich durch einen einzigen Stamm repräsentiert sind und als  $N$  die Gesamtzahl aller betrachteten Isolate. Eine Coverage von 80 % bedeutet, daß 80 % der Kolonien auf einer Agarplatte durch einen Vertreter in der Isolate – bzw. Klonbank repräsentiert wird. Wohlgemerkt, dieser Wert ermöglicht keine Aussage darüber, wieviele verschiedene OTUs insgesamt hätten isoliert werden können, denn der nicht erfaßte Prozentsatz der Coverage kann sich auf wenige abundante oder zahlreiche nicht abundante OTUs verteilen.

Da einige OTUs an mehreren Stationen und / oder von beiden verwendeten Medien isoliert worden konnten, wurde die Coverage mehrfach berechnet: Aufgeschlüsselt wurden die Datensätze der Isolate ① nach taxonomischer Affiliation, ② nach Tiefenstufen, ③ nach Station und nach Nährmedium, ④ nur nach Stationen, ⑤ nur nach Nährmedien, bzw. ⑥ alle Datensätze für Isolate einerseits und molekulare Klone andererseits wurden vereinigt und in ihrer Gesamtheit betrachtet. Diese Vereinigung von Datensätzen ist nicht unkritisch zu betrachten, werden durch diesen Prozeß doch Individuen verschiedenen Ursprunges in eine Probe zusammengewürfelt. Durch die Vereinigung von Datensätzen wird aber andererseits die Grundgesamtheit an Individuen in den Proben erhöht und dadurch in vielen Fällen erst die Möglichkeit zur statistisch gesicherten Quantifizierung gegeben. Insofern ist das Vereinigen von Datensätzen als Kompromiß zwischen der wünschenswerten Trennung aller Proben und der Einbeziehung einer möglichst hohen Anzahl an Individuen in die jeweils betrachtete Grundgesamtheit.

<b>Auswahl betrachteter Proben Isolate</b>	<b>Anzahl Taxa mit Freq=1 (n<sub>1</sub>)</b>	<b>Anzahl Isolate bzw. Klone (N)</b>	<b>Anzahl versch. Taxa</b>	<b>Coverage C x 100 [%]</b>
Alpha-Proteobakterien	4	22	8	81,8
Gamma – Proteobakterien	1	135	14	99,3
Bacteroides – Flavobacterium	3	15	6	80,0
<i>Actinobacteria</i>	12	38	22	68,4
<i>Firmicutes</i> Niedrig – G+C	2	7	4	71,4
<i>Fungi</i> , Eukaryota	1	10	2	90,0
Fraktion < 1 µm (freilebend)	17	47	21	63,8
Gesamtfraktion (ungefiltertes Meerwasser)	26	97	39	73,2
Fraktion > 1 µm (partikelgebunden)	17	82	33	79,3
S1 + S2, 5 m – 10 m	6	30	12	80,0
S1 + S2, 30 m – 150 m	19	118	40	83,9
S1 + S2, 200 m – 460 m	11	44	18	75,0
S1 + S2, 600 – 700 m	11	35	17	68,6
S1 – MB-Medium	11	55	19	80,0
S1 – NMS+MeOH-Medium	7	30	10	76,7
S2 – MB-Medium	19	58	29	67,2
S2 – NMS+MeOH-Medium	10	43	19	76,7
S1 – alle Isolate	15	85	24	82,4
S2 – alle Isolate	20	101	39	82,2
Punkt B – alle Isolate	7	41	15	82,9
MB – Medium – alle Isolate	26	123	45	78,9
NMS+MeOH-Medium – alle Isolate	14	104	29	86,5
Alle Isolate	23	227	56	89,9
<b>Auswahl betrachteter Proben Klonbank Dr. R. Christen</b>	<b>Anzahl Taxa mit Freq=1 (n<sub>1</sub>)</b>	<b>Anzahl Isolate bzw. Klone (N)</b>	<b>Anzahl versch. Taxa</b>	<b>C x 100 [%]</b>
S1 – 140 m	16	39	24	59,0
S1 – 420 m	23	46	27	50,3
S1 – 700 m	23	36	28	36,1
S2 – 100 m	20	37	27	45,9
S2 – 400 m	14	43	20	67,4
S1 – alle molekularen Klone	43	121	62	64,5
S2 – alle molekularen Klone	26	80	36	67,5
Alle molekularen Klone	54	201	83	73,1

Tabelle 27: Bestimmung der Coverage nach Good (1953) für die untersuchten mediterranen Isolate und für die Klonbank von Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997). Molekulare Klone von Dr. Christen wurden zu einer OTU zusammengefasst, wenn die Vertreter dieser OTU nicht mehr als 2 % Sequenzunterschiede im betrachteten Bereich aufwiesen. Abkürzungen: n<sub>1</sub>, Anzahl aller Isolate bzw. molekularen Klone, die im betrachteten Probenumfang lediglich durch einen einzigen Vertreter repräsentiert sind; N die Gesamtzahl aller betrachteten Isolate; C, Coverage, bezogen auf den jeweiligen Probenausschnitt; in der Tabelle mit 100 multipliziert, um eine Angabe in % zu ermöglichen; Freq, Frequenz; versch., verschiedene. Weitere Angaben siehe Text.



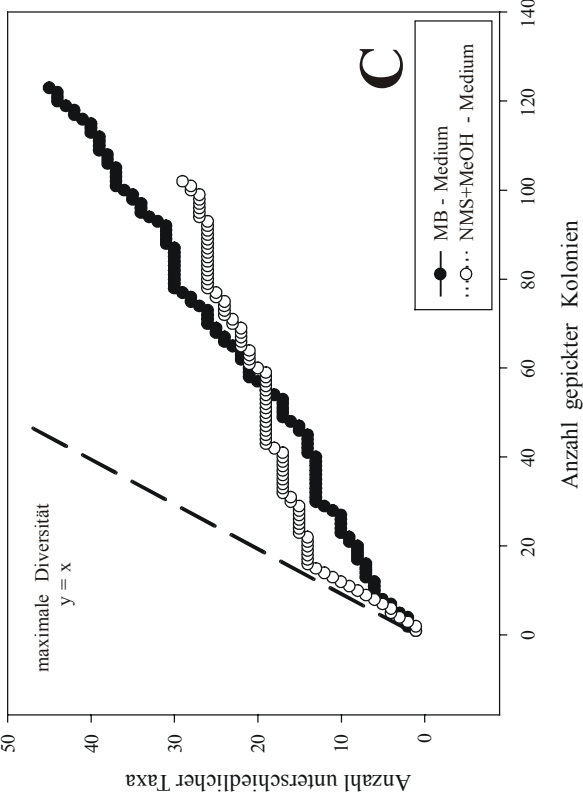
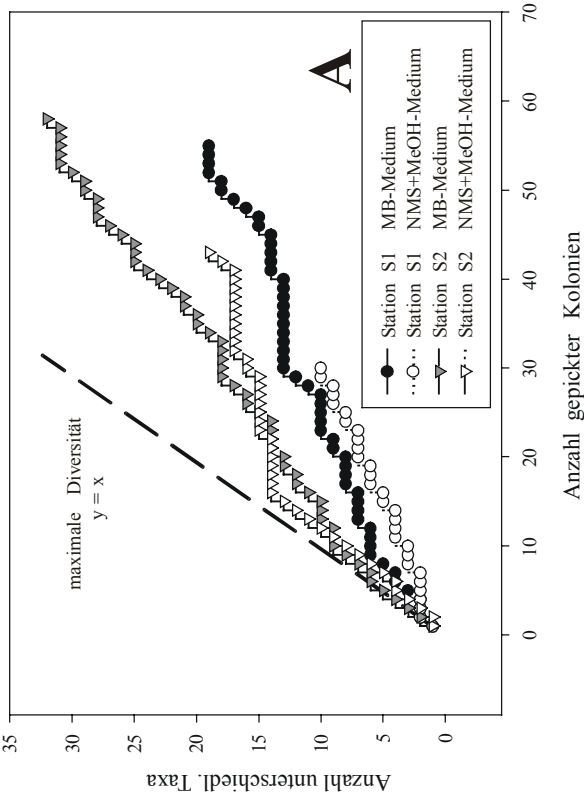
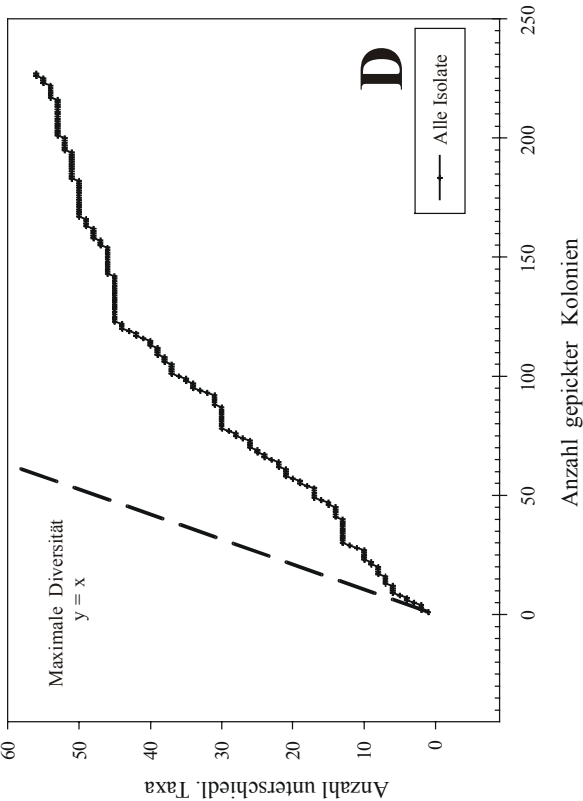
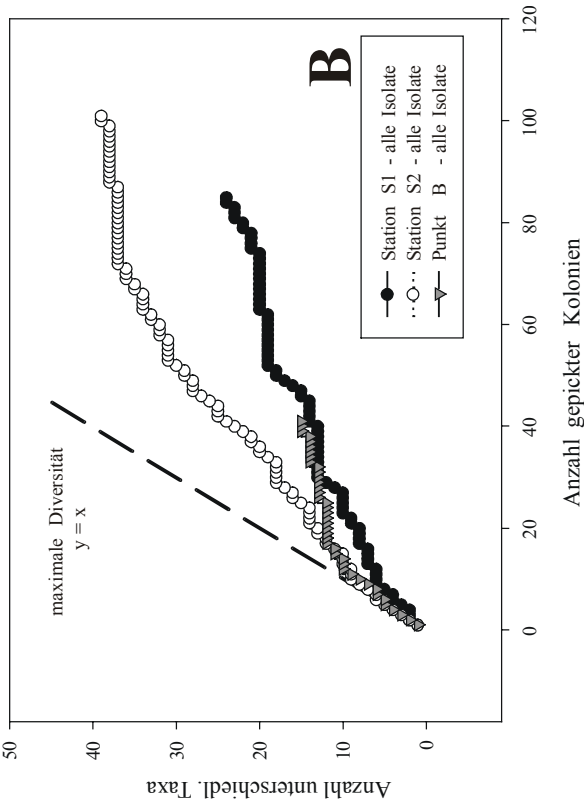


Abbildung 77 (Seite 229): Detektion neuer OTUs als Funktion der Anzahl untersuchter Kolonien für mediterrane Isolate.

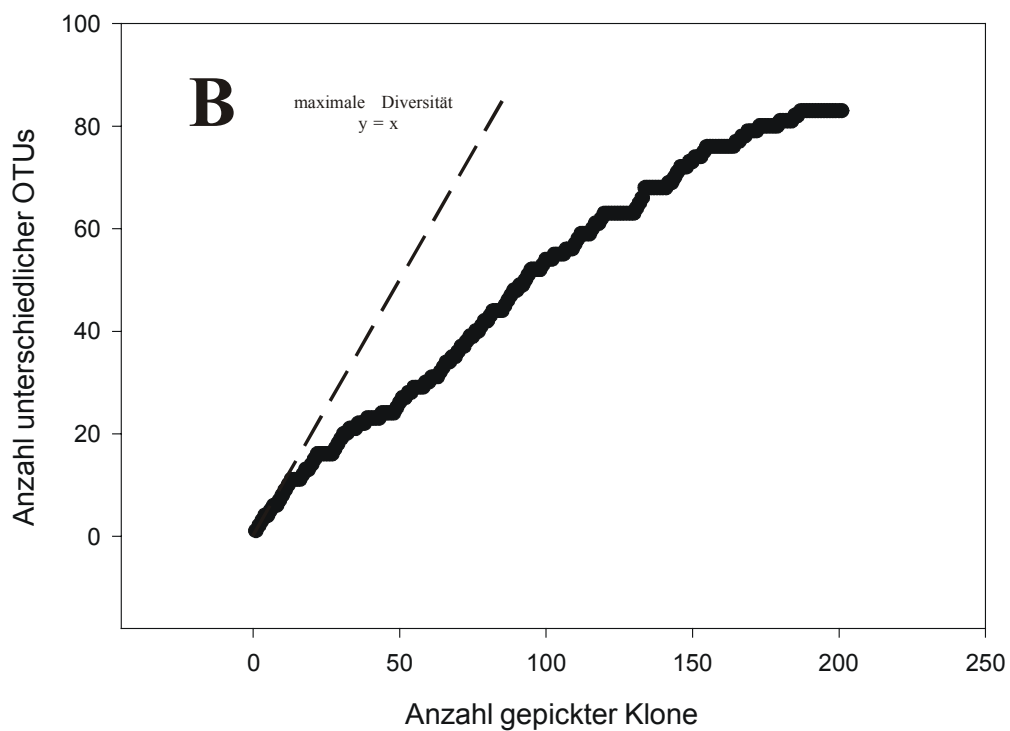
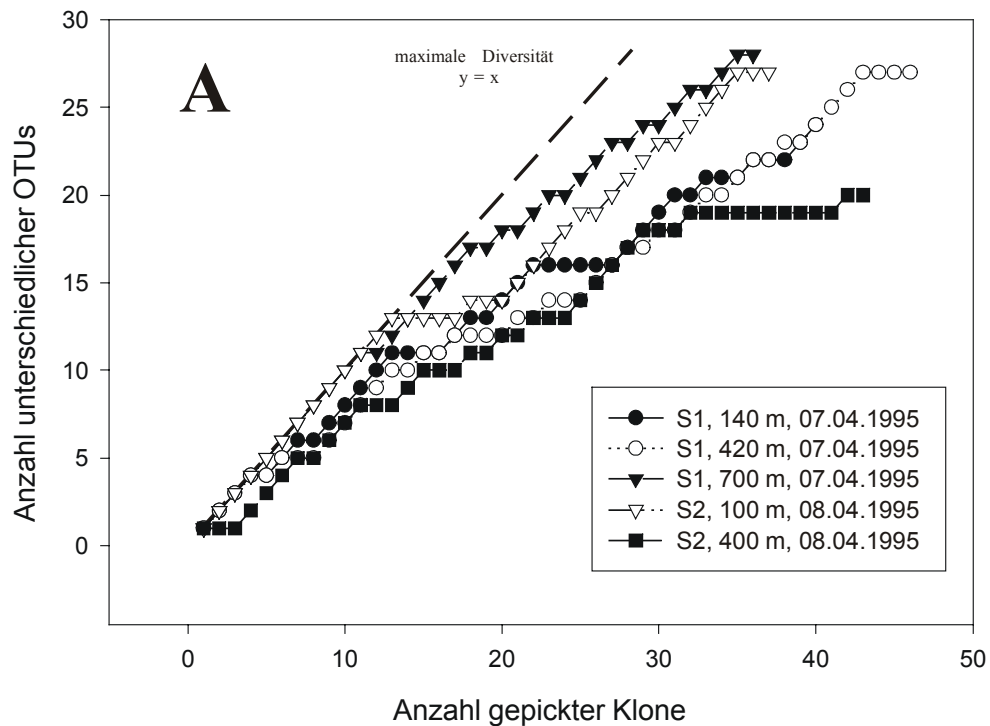


Abbildung 78: Detektion neuer OTUs als Funktion der Anzahl untersuchter Kolonien für molekulare Klone aus der Klonbank von Dr. Christen.

Zur Analyse nach Tiefenstufen wurde der Wasserkörper in vier Bereiche unterteilt, das Oberflächenwasser [5 m – 10 m], die euphotische Zone [30 m – 150 m], sowie zwei Tiefenstufen [200 m – 460 m] bzw. [600 m – 700 m]. Isolate der Stationen S1 und S2 wurden zur Analyse nach Tiefenstufen zusammengefaßt. Molekulare Klone der Klonbank von Dr. Christen (siehe Abschnitt 4.2.4.3) wurden nach der jeweils beprobten Tiefenstufe, nach den Stationen S1 und S2 sowie nach der Gesamtheit aller molekularen Klone aufgeschlüsselt. Als eine OTU wurde für die Isolate der Besitz als identisch erachteter LMW-RNA – Profile, im Zweifelsfalle eine Identität der 16S rRNA – Gensequenzen von mehr als 98 % zugrundegelegt. Molekulare Klone von Dr. Christen wurden zu einer OTU zusammengefasst, wenn die Partialsequenzen dieser Klone im Bereich der *E. coli* – homologen Positionen 342 – 906 des 16S rRNA - Gens zu einem willkürlich festgelegten Typstamm eines Clusters mehr als 98 % Identität aufwiesen. Unter Berücksichtigung der von Dr. Christen verwendeten Methodik (Sequenzierung lediglich des reversen DNA – Stranges mit lediglich einem Primer, homolog zu *E. coli* – Positionen 519 – 536 und einem Sequenase T7 Polymerase – Protokoll, wie beschrieben in Cilia (1996)) (auf welche sich Ruimy *et al.* (1997) beziehen) liegt die OTU - Grenze in etwa bei dem Auflösungsvermögen dieser Methodik, d.h. Sequenzen mit > 98 % Sequenzidentität wurden als ununterscheidbar betrachtet. Die ermittelten Werte für die Coverage sind in Tabelle 27 angegeben.

Bei Betrachtung der Daten zeigen sich eine Reihe von Tendenzen:

- Die Coverage an Station S1 entsprach in etwa der Coverage an Station S2.
- Die Coverage der auf NMS + Methanol – Medium herangezogenen Isolate war an S1 etwas niedriger, an S2 deutlich höher als diejenige der von MB – Medium isolierten Stämme.
- Die Coverage stieg in der Reihenfolge freilebende Fraktion < Gesamtfraktion < partikelgebundene Fraktion. Allerdings wurde die freilebende Fraktion durch eine deutlich geringere Anzahl an Isolaten repräsentiert als die Gesamtfraktion und die partikelgebundene Fraktion.
- Die Coverage stieg, wenn die Isolate oder molekularen Klone entweder nach Medium, nach Station oder insgesamt zusammengefaßt wurden. Je mehr Isolate bzw. molekulare Klone zusammen betrachtet worden waren, um so höher war die Coverage. Das bedeutet, daß ein großer Teil der Spezies je Station nur ein einziges Mal vorkamen, bei gleichzeitiger Betrachtung aller Stationen jedoch mehrere Male gefunden wurden.
- Die Coverage sank leicht mit steigender Tiefe.
- Unterschiedliche taxonomische Gruppen wiesen eine unterschiedliche Coverage auf. Die höchste Coverage, 99,3 %, wurde bei den Gamma – Proteobakterien gefunden. Die niedrigste Coverage besaßen die *Actinobacteria* mit 68,4 %.
- Die Coverage der molekularen Klone war niedriger und damit die Diversität höher, als die bei den Isolaten beobachtete Coverage bzw. Diversität.

Coverages für Proben von Isolaten lagen in dieser Untersuchung im Bereich zwischen 63,8 und 99,3 %, für molekulare Klone im Bereich zwischen 36,1 und 73,1 %. Diese Werte sind weitgehend konform mit weiteren Werten aus der Literatur: Suzuki *et al.* (1997) erreichte für 137 Isolate eine Coverage von 90,0 %. Mit 116 molekularen Klonen, die aus identischen

Wasserproben vor der Küste von Oregon erhalten wurden, erreichten die selben Autoren eine Coverage von 88,8 %. OTUs wurden in dieser Untersuchung über *HaeIII* RFLP-Bandenmuster und 16S rRNA – Gensequenzierung identifiziert. Rappé *et al.* (1997) ermittelten für 169 molekulare Klone vom Rande der Kontinentalplatte in North Carolina eine Coverage von 95 %, wobei sich eine OTU aus molekularen Klonen mit einer Sequenzähnlichkeit > 97 % definierte. Dieselbe Definition für eine OTU zugrundelegend, kamen Mullins *et al.* (1995) mit 42 analysierten molekularen Klonen aus Wasserproben der Sargasso-See auf eine Coverage von 81 %. Rath *et al.* (1999) erhielten mit 95 direkt von marinen Partikeln gewonnenen molekularen Klonen aus dem Golf von Triest / Adriatische See eine Coverage von lediglich 5,3 %, wobei eine OTU, wie bei Suzuki *et al.* (1997), durch *HaeIII* RFLP – Bandenmuster definiert wurde.

#### **4.2.5.2 Bestimmung der Anzahl maximal isolierbarer OTUs**

Wieviele Taxa ließen sich nun maximal aus dem Ökosystem isolieren ? Die Anzahl isolierbarer Taxa bzw. detektierbarer OTUs hängt sicherlich vom Volumen der betrachteten Umweltprobe, bzw. dem Umfang der aus dieser Umweltprobe entnommenen Stichprobe ab. Je größer das Volumen einer Umweltprobe bzw. der Stichprobe gewählt wird, desto höher ist die Anzahl der in dieser Probe detektierten Taxa, so daß theoretisch bei beliebig hohen Probenvolumen eine nahezu beliebig hohe Anzahl an Taxa detektiert werden kann. Praktisch kann man allerdings sehr wohl eine entsprechende Abschätzung treffen, da das Probenvolumen limitiert ist, durch die Methode bedingt nur eine endliche Anzahl an Kolonien als Ausgangsmenge erwartet werden kann und somit durch die Begrenzung des Probenvolumens Taxa unterhalb einer kritisch geringen Abundanz mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr erfaßt werden (siehe auch Abschnitt 4.3.1). Eine Abschätzung der Anzahl maximal isolierbarer Taxa aus den Umweltproben wurde folgendermaßen vorgenommen:

Voraussetzung war, daß ein Plot der Anzahl unterschiedlicher Taxa gegen die Anzahl zufällig gepickter Isolate bzw. molekularen Klone einen sättigungsähnlichen Verlauf aufwies, wie in Abbildung 77 dargestellt. Dieses Kriterium war für die molekularen Klone von Dr. Christen nicht ausgeprägt erfüllt, entsprechende Plots ließen sich, wie in diesem Abschnitt weiter unten dargestellt, sowohl durch eine exponentielle als auch eine lineare Regression approximieren und wiesen kein signifikantes Sättigungsverhalten auf (siehe auch Abbildung 78).

Zunächst wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt mit dem Ziel, eine Regressionskurve mit möglichst hoher Übereinstimmung als Modellkurve zu erhalten. Kriterium für die Auswahl geeigneter Modellkurven war ein möglichst geringes Quadrat der Standardabweichungen. Aus dem Verlauf dieser Modellkurven wurde dann der  $y$  – Wert abgeschätzt, wenn  $\lim x \rightarrow \infty$  strebt, d.h. der approximierte  $y$ -Wert bei einer unendlichen Anzahl von Pickvorgängen bestimmt.

- Eine sehr genaue Übereinstimmung mit den beobachteten Werten ergab sich für die sogenannte Mitscherlich – Funktion (Mitscherlich, 1909)

$$y = a + b e^{cx}$$

mit  $a = 70,66$ ,  $b = -72,42$ ,  $c = -0,0071$ , die ein  $R^2$  von 0,9984 zu den tatsächlichen Meßwerten aufwies und damit im Meßbereich eine nahezu vollkommene Übereinstimmung zeigte. Für  $\lim x \rightarrow \infty$  strebt der Term  $b * e^{cx}$  gegen 0 und  $y$  folglich gegen  $a$ , bzw. 70,7. Somit hätten nach diesem Modell maximal 71 verschiedene Taxa aus den Proben isoliert werden können. Eine Wertetabelle (Tabelle 28) zeigt für  $y$ -Werte  $>10$  die gute Übereinstimmung der prognostizierten mit der tatsächlich gemessenen Anzahl am Pickvorgängen, um eine gewisse Anzahl an OTUs zu erhalten. Demzufolge wären zum Auffinden von 14 der verbleibenden 15 nicht isolierten OTUs 438 zusätzliche Pickvorgänge notwendig gewesen. Für  $y$ -Werte  $<5$  lieferte das Modell keine sinnvollen Prognosen. Ein grafischer Vergleich aus der Mitscherlich – Funktion prognostizierter mit tatsächlich erhaltenen Meßwerten ist in Abbildung 79 dargestellt.

Anzahl untersch. OTUs	10	20	30	40	50	56	60	65	70
prognostizierte Anzahl	25	50	81	121	167	224	269	359	662
tatsächliche Anzahl	24	57	78	113	177	226	-	-	-

Tabelle 28: Vergleich der nach dem Modell  $y = a + b e^{cx}$  prognostizierten mit der tatsächlich gemessenen Anzahl notwendiger Pickvorgänge, um eine gewisse Anzahl verschiedener Isolate - OTUs zu erhalten. Weitere Angaben sowie zugrundegelegte Werte für die Variablen  $a$ ,  $b$  und  $c$  siehe Text.

- Eine zweite Abschätzung erfolgte über das ebenfalls gut übereinstimmende Modell

$$y = a (1 - e^{(-bx)})$$

mit  $a = 74,12$  und  $b = 0,0064$ . Das  $R^2$  zu den Meßwerten betrug in dieser Gleichung 0,9872, zeigte also eine sehr gute Übereinstimmung. Für  $\lim x \rightarrow \infty$  strebt  $y$  gegen  $a$ , also in diesem Falle gegen 74,12. Somit ließe sich nach diesem Szenario die Isolation von maximal 74 Taxa erwarten.

- Eine dritte Abschätzung wurde getroffen, indem  $1-(n_s/N)$  gegen  $N$  mit  $n_s$  = Anzahl verschiedener Taxa,  $N$  = Gesamtzahl aller Isolate in der zufälligen Reihenfolge des Pickens aufgetragen wurde. Das Resultat war eine Kurve, die mit wachsendem  $x$  eine stetig geringere, aber immer positive Steigung aufwies. Der maximale Wert dieses Graphen beträgt 1, der minimale Wert 0. Für den Datenpunkt  $x = 227$  betrug der  $y$  – Wert 0,753, welcher  $y = 1-(n_s/N) = 1-(56/225)$  entsprach. Damit wurde für den Wert  $y = 1$  eine maximale Anzahl von  $69,8 \approx 70$  Taxa abgeschätzt. Ein mathematischer Schönheitsfehler dieses Verfahrens ist allerdings, daß die unabhängige Variable  $N$  außer in der  $x$ -Achse auch im Term  $1-(n_s/N)$  auf der  $y$ -Achse auftaucht, was zur Folge hat, daß der Graph  $f(N) = 1-(n_s/N)$  keinen stetigen Verlauf aufweist.

Es zeigte sich, daß die Gesamtzahl der isolierbaren Taxa nach den drei verwendeten Methoden zur Abschätzung etwa bei  $70 \pm 5$  (95 % Konfidenzintervall) lag und daß dieser Abschätzung folgend, rund 75 % aller mit der verwendeten Methode isolierbaren Taxa isoliert worden waren. Dieser für die Gesamtzahl aller Isolate ermittelte Wert unterscheidet sich von dem Wert für die Coverage (89,9%). In Unterschied zum erstgenannten Wert flossen in die Berechnung des letzteren in gewissem Maße auch die Abundanzen der einzelnen Taxa mit ein. Siehe hierzu auch Abschnitt 4.2.5.3.2

Eine Abschätzung der Gesamtanzahl von OTUs in der Klonbank von Dr. Christen führte zu einem unzuverlässigen Ergebnis: Zwei Abschätzungen über Exponentialfunktionen ergaben zwar hervorragende Korrelationen: Eine Abschätzung mit  $y = a + b e^{cx}$  ergab für  $a = 162,8$ ,  $b = -162,4$  und  $c = -0,0038$  ein  $R^2$  von 0,9956. Die Abschätzung für die Funktion  $y = a(1 - e^{-bx})$  ergab für  $a = 159,2$  und  $b = 0,0040$  ebenfalls eine sehr gute Approximation der tatsächlich gefundenen Meßwerte, das Quadrat der Standardabweichung betrug 0,9948. Die Approximation anhand des Plots  $f(N) = 1 - (n_s/N)$  ergab eine etwas niedrigere zu erwartende Gesamtzahl von ca. 141 OTUs. Den ersten beiden Modellen zufolge ließen sich mit Hilfe von 16S rRNA Genanalysen der Klonbank aus vorliegendem Probenmaterial etwa  $160 \pm 12$  (95 % Konfidenzintervall) unterschiedliche OTUs in der Klonbank auffinden, also lediglich etwa doppelt so viele wie mittels Isolation von Stämmen aus der Umweltprobe. Demzufolge wurden mit 201 molekularen Klonen etwa 52 % aller vorhandenen OTUs gefunden. Die gute Übereinstimmung der prognostizierten Anzahl an Pickvorgängen, um eine bestimmte Anzahl an OTUs zu erhalten, geht aus der in Tabelle 29 aufgeführten Wertetabelle und dem Vergleich prognostizierter mit tatsächlichen Meßwerten in Abbildung 79 hervor.

Anzahl untersch. OTUs	20	40	60	80	100	120	140	160	162
prognostizierte Anzahl	34	73	120	176	249	349	514	1059	1376
tatsächliche Anzahl	32	76	116	173	-	-	-	-	-

Tabelle 29: Vergleich der nach dem Modell  $y = a + b e^{cx}$  prognostizierten mit der tatsächlich gemessenen Anzahl notwendiger Pickvorgänge, um eine gewisse Anzahl verschiedener OTUs molekularer Klone aus der Klonbank von Dr. Christen zu erhalten. Weitere Angaben sowie zugrundegelegte Werte für die Variablen a, b und c siehe Text.

Jedoch war das Sättigungsverhalten bei der Anzahl der untersuchten molekularen Klone noch zu gering ausgeprägt; die Meßwerte ließen sich auch mit einer linearen Regression  $y = y_0 + ax$  mit  $y_0 = 6,45$  und  $a = 0,428$  bei einem  $R^2$  von 0,9845 gut approximieren. Diese Funktion strebt für  $\lim x \rightarrow \infty$  ebenfalls gegen  $\infty$  und erlaubt deshalb keine Abschätzung der Anzahl zu erwartender OTUs. Daraus wurde gefolgert, daß die Anzahl der untersuchten molekularen Klone zu gering war, um über eine Abschätzung des Sättigungsverhaltens eine entsprechende Aussage treffen zu können.

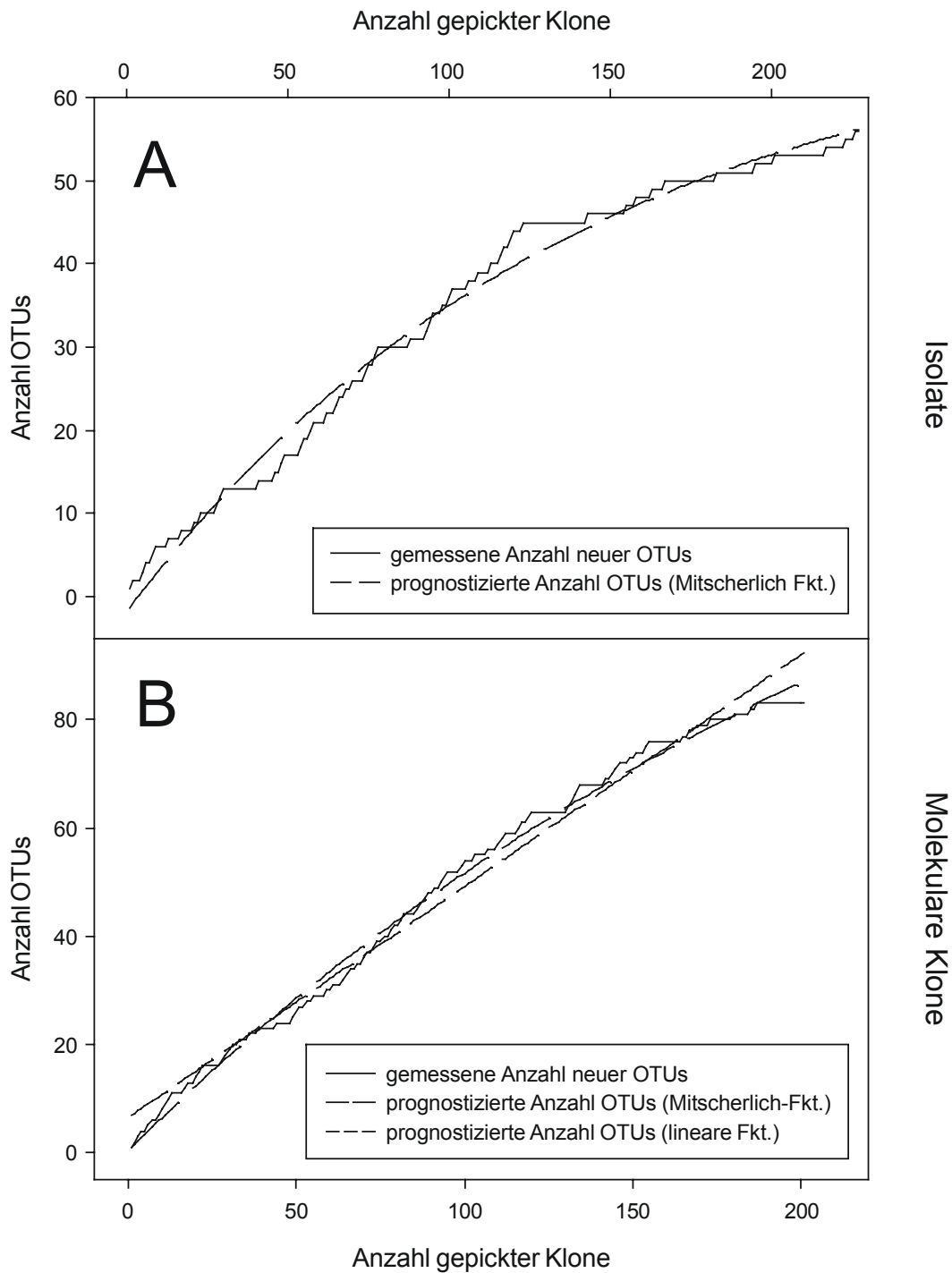


Abbildung 79: Vergleich der Anzahlen tatsächlich erhaltener neuer OTUs je Pickvorgang, verglichen mit den prognostizierten Werten aus der approximierten Mitscherlich – Funktion ( $y = a + b e^{cx}$ ) (Mitscherlich, 1909) und – für molekulare Klone – einer linearen Approximation ( $y = y_0 + ax$ ). A: Vergleich der Ergebnisse mit den Prognosen für Isolate, B: Vergleich für molekulare Klone aus der Klonbank von Dr. Christen. Abkürzungen: OTUs, operationale taxonomische Einheiten; Fkt., Funktion. Zahlenwerte für a, b, c und  $y_0$  sind im Text aufgeführt.

### 4.2.5.3 Diversitäts – und Ähnlichkeitsindizes

#### 4.2.5.3.1 Definitionen

Verschiedene Indizes spiegeln verschiedene Aspekte der zu vergleichenden Datensätze wieder, sie helfen, bestimmte Fragen anhand eines vorhandenen Datensatzes zu beantworten. Da jeder Index nur sehr konkrete Fragestellungen beantworten kann, ist es notwendig, mehrere Indizes aus dem Datensatz zu errechnen und diese Indizes vergleichend zu diskutieren. Bei der Auswahl geeigneter Indizes war in vorliegendem Fall darauf zu achten, daß die Berechnung aufgrund einer Auswahl der Gesamtbiozönose (= Probe) erfolgen konnte und keine zwingende Kenntnis der gesamten mikrobiellen Lebensgemeinschaft voraussetzte. Allgemein wird unterschieden zwischen Diversitäts – Indizes, mit deren Hilfe man Aussagen über die Diversität innerhalb einer Probe treffen kann, und Ähnlichkeitsindizes, welche auf einem Vergleich der Ähnlichkeiten zwischen zwei unterschiedlichen Proben beruhen. Diversitätsindizes können untergliedert werden in OTU – abhängige Indizes, bei denen Aussagen zur Diversität anhand einer Gruppierung von Individuen einer Probe zu willkürlich festgelegten OTUs erfolgen, sowie in speziesunabhängige Indizes, deren Grundlage die Analyse taxonomischer Distanzen bilden. Im Folgenden werden diskutiert: Die OTU – abhängigen Diversitäts – Indizes von Shannon - Wiener, McIntosh, Simpson sowie Keefe und Bergersen; der OTU – unabhängige Diversitätsindex von Watve und Gangal und schließlich zwei Ähnlichkeitsindizes, der Jaccard - und der PSC – Index („Percentage Similarity“). Eine ausführliche Diskussion der verwendeten Indizes findet sich in (Washington, 1984). Es gelten dabei folgende Abkürzungen:

$S$  = Anzahl der Spezies in einer Probe oder einer „Population“

$K$  = Anzahl der Taxa in einer Probe oder einer „Population“

$n$  = Anzahl an Individuen in einer Probe oder einer „Population“

$n_i$  = Anzahl an Individuen einer OTU  $i$  in einer Probe oder einer „Population“

$p_i = n_i / n$  = Anteil der Individuen einer OTU  $i$  an der Gesamtzahl der Individuen in einer Probe oder einer „Population“

Als Probe, bzw. als „Population“ wird in diesem Abschnitt die Gesamtheit aller Individuen bezeichnet, die hinsichtlich eines zu vergleichenden Merkmales in eine Kategorie zusammengefaßt werden können. Diese Kategorien können basieren auf dem Ort der Isolation (S1, S2, Punkt B), dem zur Isolation verwendeten Medium (MB, NMS+Methanol), der Wassertiefe, der Zugehörigkeit in eine taxonomische Großgruppe oder einer Kombination dieser Merkmale.



#### 4.2.5.3.1.1 Diversitäts – Indices

- Der Shannon – Wiener Index  $H'$  (Shannon & Weaver, 1949), (Wiener, 1948)

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{n}$$

leitet sich aus der Informationstheorie ab und stellt ein Maß für die Unsicherheit des Resultates einer Auswahl dar. Good (1953) wendete diesen Index als Maß für die Heterogenität von Populationen an. Niedrige Werte für  $H'$  stellen ein geringes Maß, hohe Werte ein hohes Maß für Shannons „Entropie“ dar. Für biologische Systeme liegt  $H'$  unter 10, meistens sogar unter 5.

- Der Index von McIntosh,  $M$ , (McIntosh, 1967)

$$M = \frac{n - \sqrt{\sum_{i=1}^S n_i^2}}{n - \sqrt{n}}$$

ist in diesem Fall ein Maß für die Verteilung von Individuen einer „Population“ oder einer Probe auf taxonomische Einheiten. Der Index kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Eine gleichmäßige Verteilung von Individuen auf OTUs ergibt einen Wert nahe 1 für  $M$ , ein kleiner  $M$  – Wert nahe 0 weist auf eine ungleichmäßige Verteilung zahlreicher Individuen auf nur wenige Taxa hin.

- Simpsons Index  $D$  (Simpson, 1949)

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, daß zwei zufällig und unabhängig ausgewählte Individuen einer „Population“ oder einer Probe zur selben OTU gehören. Der Index nimmt Werte zwischen 0 (unwahrscheinlich) und 1 (wahrscheinlich) an.

- Keefe und Bergersens Index  $TU$  (Keefe & Bergersen, 1977)

$$TU = 1 - \left( \sum_{i=1}^K \left( \frac{n_i}{n-1} \right) \left\{ p_i^2 - \frac{1}{n} \right\} \right)$$

stellt eine Modifikation des Simpson – Indexes dar: Verschiedene Individuen werden aus

Probenmaterial gesammelt und zum jeweils vorher gezogenen Individuum in Beziehung gesetzt. Die Quadratsumme der relativen Anteile der Individuen verschiedener OTUs wird dann zur Gesamtzahl aller Individuen in Relation gesetzt. Dieser Index gibt annähernd das Reziproke der Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei oder mehrere zu einer gemeinsamen OTU gehörenden Individuen hintereinander aus einer Probe gezogen werden und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Näherungsweise stellt dieser Index das Komplement zu Simpsons D dar und summiert sich mit diesem zu 1 auf.

- Die Coverage (Good, 1953) wurde bereits erwähnt und in Abschnitt 4.2.5.1 berechnet.
- Watve und Gangals speziesunabhängiger Diversitätsindex (Watve & Gangal, 1996). Dieser Index wird in Abschnitt 4.2.5.3.2.2 beschrieben.

#### **4.2.5.3.1.2 Ähnlichkeits-Indices:**

- Jaccards Index (Jaccard, 1908)

$$J = 100 \frac{n_c}{n_i + n_j}$$

gibt die Anzahl gemeinsamer Spezies in zwei zu vergleichenden Proben an. Nur das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Taxa in den zu vergleichenden Proben geht in den Index ein, nicht deren Abundanzen.

- Der PSC – Index („Percentage Similarity“) (Whittaker, 1952), (Brock, 1977)

$$PSC = 100 - 0,5 \sum_{i=1}^K |a - b|$$

vergleicht die relativen Abundanzen von Taxa in zwei zu vergleichenden Proben. a und b bezeichnen hier für eine bestimmte Spezies den prozentualen Anteil an Individuen dieser Spezies an der Gesamtzahl der Individuen in zwei Proben, bzw. „Populationen“ A und B. Die Beträge der Differenzen prozentualer Anteile werden aufsummiert.

#### **4.2.5.3.2 Diversitäts – Indizes**

Zunächst wurden die Diversitäts-Indizes für verschiedene Proben nach oben angegebenen Formeln ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 dargestellt.

Auswahl betrachteter Proben Isolate	Shannon – Index H'	McIntosh M	Keefe & Bergersen TU	Simpson D	Watve & Gangal D <sub>mean</sub>	Varianz D <sub>mean</sub>	Kategorie
Alpha-Proteobakterien	1,58	0,70	0,84	0,16	0,0574	0,0015	B-2
Gamma – Proteobakterien	2,10	0,62	0,81	0,19	0,0761	0,0014	C
Bacteroides – Flavobacterium	1,49	0,62	0,76	0,24	0,056	0,0024	C
<i>Actinobacteria</i>	2,93	0,89	0,96	0,04	0,0694	0,001	A
<i>Firmicutes</i> Niedrig – G+C	1,28	0,72	0,81	0,19	0,0242	0,0003	A
<i>Fungi</i> , Eukaryoten	0,33	0,14	0,20	0,80	n.d.	n.d.	D
Filtrat / Freilebende Fraktion [ $< 1 \mu\text{m}$ ]	2,26	0,62	0,79	0,21	0,1317	0,0068	B-1
unbehandeltes Meerwasser / Gesamtfraktion	3,08	0,79	0,92	0,08	0,1403	0,005	A
Retentat / partikelgebundene Frakt. [ $> 1 \mu\text{m}$ ]	3,21	0,86	0,96	0,04	0,1216	0,0028	A
S1 + S2, Oberflächenwasser [5 m – 10 m]	2,09	0,71	0,85	0,15	0,0999	0,0032	B-1
S1 + S2, euphotische Zone [30 m – 150 m]	3,26	0,84	0,95	0,05	0,1283	0,0028	A
Tiefenstufe I [200 m – 460 m]	2,24	0,64	0,81	0,19	0,1181	0,0065	B-1
Tiefenstufe 2 [600 m – 700 m]	2,54	0,80	0,91	0,09	0,1553	0,0075	A
S1 – MB-Medium	2,27	0,65	0,82	0,18	0,1157	0,0045	B-1
S1 – NMS+MeOH-Medium	1,56	0,50	0,67	0,33	0,0824	0,0046	C
S2 – MB-Medium	3,26	0,90	0,97	0,03	0,1346	0,0027	A
S2 – NMS+MeOH-Medium	2,75	0,84	0,94	0,06	0,1467	0,0064	A
S1 – alle Isolate	2,2	0,57	0,77	0,23	0,1071	0,0049	C
S2 – alle Isolate	3,36	0,87	0,96	0,04	0,1444	0,0044	A
Punkt B – alle Isolate	2,35	0,86	0,89	0,11	0,1241	0,0058	A
MB – Medium – alle Isolate	3,2	0,79	0,93	0,07	0,1334	0,0035	A
NMS+MeOH-Medium – alle Isolate	2,87	0,78	0,92	0,08	0,1288	0,0054	B-1
Alle Isolate	3,33	0,78	0,93	0,07	0,1334	0,0051	B-1
Auswahl betrachteter Proben Klonbank Dr. R. Christen	Shannon – Index H'	McIntosh M	Keefe & Bergersen TU	Simpson D	Watve & Gangal D <sub>mean</sub>	Varianz D <sub>mean</sub>	Kategorie
S1 – 140 m	2,89	0,87	0,95	0,05	0,1598	0,0065	A
S1 – 420 m	2,73	0,73	0,88	0,12	0,1746	0,0084	A
S1 – 700 m	3,22	0,94	0,98	0,02	0,1762	0,0058	A
S2 – 100 m	3,1	0,92	0,97	0,03	0,1844	0,0075	A
S2 – 400 m	2,43	0,7	0,85	0,15	0,1480	0,0073	A
S1 – alle molekularen Klone	3,68	0,86	0,96	0,04	0,1819	0,0063	A
S2 – alle molekularen Klone	3,13	0,81	0,93	0,07	0,1729	0,007	A
Alle molekularen Klone	3,72	0,82	0,95	0,05	0,1803	0,0066	A

Tabelle 30: Bestimmung der Diversitätsindizes für verschiedene Proben. Die Proben wurden, entsprechend ihrer unterschiedlichen Diversitäten in Kategorien unterteilt. Kategorien wurden aus den Verhältnissen der Diversitätsindizes untereinander gebildet und reflektieren kennzeichnende Aspekte der unterschiedlichen Strukturen mikrobieller Lebensgemeinschaften. Zur Definition der Kategorien siehe Text. Hinsichtlich der Diversität ordnen sich die Kategorien wie folgt: hohe Diversität – A > B-1 > B-2.1 > B-2.2 > B-3 – niedrige Diversität.

Aufgrund oben genannter Definitionen zur Errechnung der Indizes ließen sich die in Tabelle 30 und Tabelle 27 angegebenen Indizes für die unterschiedlichen Proben leicht interpretieren. Die Ergebnisse bestätigten die in Abschnitt 4.2.5.1 und Abschnitt 4.2.5.3.2.2 dargestellten Beobachtungen und sollen an dieser Stelle nicht noch einmal wiederholt werden.

#### **4.2.5.3.2.1 Analyse OTU – abhängiger Diversitätsindizes**

Weitere Aussagen zum Probenmaterial lassen sich durch einen Vergleich der Indizes untereinander treffen. Direkt vergleichen lassen sich die Indizes, deren Wertebereich zwischen 0 und 1 liegt. Das betrifft alle Indizes mit Ausnahme des Shannon-Wiener Index, also die Indizes von Simpson, McIntosh, Keefe und Bergersen sowie die Coverage. Diese vier Indizes können in Abhängigkeit von ihrer Größe miteinander verglichen werden und aus dem Vergleich Rückschlüsse auf die Struktur der durch diese Indizes repräsentierten Proben, bzw. „Populationen“ gezogen werden. Im Folgenden werden verschiedene Kategorien von Biozönosestrukturen, definiert durch die Größenverhältnisse der betreffenden Indizes, in der Reihenfolge abnehmender Diversität aufgelistet. Beim Vergleich dieser vier Indizes traten in allen Proben folgende Gemeinsamkeiten auf:

- Der Index von Simpson wies immer den niedrigsten Wert auf. Einzige Ausnahme war die Probe der *Fungi*, welche sich aus 10 auf zwei OTUs verteilten Individuen konstituierte und 9 Individuen einer OTU zugeordnet wurden. Hier erreichte D einen Wert von 0,81. Diese Probe extrem geringer Diversität konnte keiner der hier vorgestellten Kategorien zugeordnet werden. Da sich der Index von Simpson in der Praxis komplementär zu Keefe und Bergersens Index TU verhielt und sich mit diesem zu 1 aufaddieren ließ, wurde er in nachfolgender Betrachtung nicht weiter berücksichtigt.
- Der Index von McIntosh wies in keinem Falle den höchsten Wert auf. In jedem Fall besaß der Index von Simpson einen höheren Wert als der Index von McIntosh.

**Kategorie A:** Keefe – Bergersen > McIntosh > Coverage > Simpson: Hohe Diversität – gleichmäßige Verteilung. Für alle Proben molekularer Klone sowie für sehr diverse Proben von Isolaten galten diese Verhältnisse der Indizes zueinander. Diese Größenverhältnisse der Indizes zueinander signalisierten ein sehr hohes Maß an Diversität und ein extrem geringes Maß an Redundanz: Simpsons D, die Wahrscheinlichkeit, daß zwei zufällig gezogene Individuen der Probe einer gemeinsamen OTU angehören, war gering, Keefe – Bergersens TU folglich hoch. McIntoshs Index, ein Indikator für die Gleichmäßigkeit der Verteilung von Individuen auf OTUs, war ebenfalls hoch. Abundante Organismen waren nur in geringem Maße vorhanden, keine OTU dominierte zahlenmäßig. Deswegen bestand eine große Wahrscheinlichkeit, daß das Probenmaterial die Gesamtbiozönose nicht vollständig abdeckte, die Coverage war oft niedrig, sie umfaßte etwas mehr als 50 % aller molekularen Klone, konnte aber bei Proben von Isolaten bis zu 84 % erreichen. Der Shannon – Wiener Index erreichte in dieser Kategorie Werte, die im Mittel deutlich über 2,5, meist sogar über 3,0 lagen. Ausnahmen hiervon bildeten lediglich zwei Proben von Isolaten: *Firmicutes* [Niedrig-G+C] mit einem Shannon – Wiener Index von 1,28 (7 Isolate verteilten sich auf 4 Taxa mit den Abundanzen 3-2-1-1) und S1 [MB-Medium] mit einem Index von 2,27 (eine dominante OTU mit 39 % und eine abundante OTU mit 13 % Anteil an der Gesamtzahl der Individuen,

aber ansonsten zahlreiche OTUs mit niedriger Abundanz). Zahlreiche OTUs wurden lediglich durch einen einzigen Vertreter repräsentiert, die Wahrscheinlichkeit, je neuen Pickvorgang eine neue OTU zu finden, war hoch. Die Diversität der molekularen Klone überstieg die Diversität der Proben von Isolaten. Entsprechende Indizes von Shannon, McIntosh und Simpson waren in dieser Kategorie für Isolate entweder immer oder in der Regel niedriger als die entsprechenden Indizes der molekularen Klone. Der Index von Keefe - Bergersen und die Coverage lagen für die Proben von Isolaten immer oder fast immer über den Werten für molekulare Klone. Zu dieser Kategorie gehörten folgende Proben: Alle Proben molekularer Klone sowie folgende Proben von Isolaten: *Actinobacteria* und *Firmicutes* [Niedrig G+C], unbehandeltes Meerwasser / Gesamtfraktion, Retentat / partikelgebundene Frakt. [ $> 1 \mu\text{m}$ ], euphotische Zone S1 + S2 [30 m – 150 m], Tiefenstufe 2 S1 + S2 [600 m – 700 m], S2 [MB - und NMS + Methanol – Medium], S2 [alle Isolate], Punkt B [alle Isolate] und MB – Medium [alle Isolate].

**Kategorie B:** Keefe - Bergersen  $>$  Coverage  $>$  McIntosh  $>$  Simpson: Die Wahrscheinlichkeit, aus einer Probe zwei Individuen auszuwählen, die einer gemeinsamen OTU angehören, war hoch bis sehr hoch. Abundante OTUs vereinigten weniger als 50 % aller Individuen einer Probe auf sich. Zwei Fälle konnten in dieser Kategorie unterschieden werden: **Fall 1 (Kategorie B-1):** Mäßig hohe Diversität – ungleichmäßige Verteilung. Der Shannon – Weaver Index war relativ hoch (für die Isolate  $> 2$ ). Dann galt: Die Individuen waren zum Teil gleichmäßig auf verschiedene OTUs verteilt, der verbleibende Teil der Individuen aber konzentrierte sich auf eine OTU mit hoher Abundanz. Die Abundanz dieser OTU erreichte allerdings nie 50 % aller Individuen oder mehr. Folglich war die Coverage der Proben mäßig hoch bis hoch. Als Beispiel dient die Probe Tiefenstufe 1 [200 m – 460 m]: 43 % der 118 Isolate gehörten einer einzigen OTU an, alle verbleibenden OTUs besaßen jeweils einen Anteil von 2 % bis 7 %, im Schnitt 3,4 % an der Gesamtzahl der Individuen. Die Wahrscheinlichkeit, in dieser Beispielprobe zufällig einen nicht zur abundanten OTU B gehörendes Individuum zu ziehen, betrug  $1 - 0,43 = 0,57$  oder 57 %. Zu dieser Kategorie gehörten folgende Proben: Isolate: Filtrat / Freilebende Fraktion [ $< 1 \mu\text{m}$ ], Oberflächenwasser S1 + S2 [5 m – 10 m], Tiefenstufe 1 S1 + S2 [200 – 460 m], S1 [MB – Medium], NMS + Methanol – Medium [alle Isolate] und die Gesamtheit aller Isolate. **Fall zwei (Kategorie B-2):** Niedrige bis mäßig hohe Diversität – ungleichmäßige Verteilung. Der Shannon – Weaver – Index war niedrig und lag für Proben von Isolaten unter 2. Die Probe bestand dann zum großen Teil aus wenigen, aber nahezu gleichmäßig abundanten OTUs, allerdings gehörte ein großer Teil der verbleibenden Individuen zu OTUs mit einer Frequenz von 1. Einziger Vertreter dieser Kategorie war die Probe der Alpha-Proteobakterien: 22 Individuen verteilten sich auf 7 OTUs, wobei die drei abundanten OTUs A, F und H jeweils 27 %, 18 % und 27 % an der Gesamtzahl der Individuen der Probe hatten.

**Kategorie C:** Coverage  $>$  Keefe - Bergersen  $>$  McIntosh  $>$  Simpson: Niedrige Diversität – ungleichmäßige Verteilung. Die Probe deckte einen großen Teil der Isolate bzw. molekularen Klone ab. Die Individuen waren sehr ungleichmäßig auf die OTUs verteilt, der größte Teil der Individuen verteilte sich auf wenige Spezies mit hoher Abundanz. Folglich war die Wahrscheinlichkeit, daß zwei zufällig ausgewählte Individuen der Probe einer gemeinsamen

OTU angehörten, hoch. Eine einzelne OTU konnte unter Umständen mehr als 50 % der Individuen einer Probe umfassen, wenige OTUs vereinigten in dieser Kategorie weit mehr als 50 % aller Individuen auf sich. Der Shannon – Index für diese Kategorie lag für die Isolate immer unter 2,5. Zu dieser Kategorie gehörten folgende Proben: Isolate: Gamma-Proteobakterien, *Bacteroides-Flavobacterium*, S1 [NMS+Methanol - Medium], S1 [alle Isolate].

**Kategorie D:** Coverage > Simpson > Keefe – Bergersen > McIntosh: Extrem niedrige Diversität – extrem ungleichmäßige Verteilung. In diese Kategorie fiel nur die bereits erwähnte Probe der Fungi: 10 Isolate verteilten sich auf zwei OTUs, von denen eine OTU durch 9 Individuen repräsentiert wurde. Simpsons D, die Wahrscheinlichkeit, daß zwei zufällig ausgewählte Spezies einer gemeinsamen OTU angehören, war folglich sehr hoch, Keefe – Bergersens TU komplementär niedrig. Die Coverage war ebenfalls sehr hoch, der McIntosh - und der Shannon – Wiener Index extrem niedrig. Das für diese Kategorie angegebene Verhältnis der Indizes zueinander markiert das untere Ende der Diversitätsskala.

Durch eine kombinierte Betrachtung mehrerer Diversitäts - und Ähnlichkeitsindizes ließen sich Eigenheiten der Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften besser beschreiben als bei Betrachtung des Probenmaterials anhand lediglich eines Index. Beispielsweise ließen sich mit dem Shannon – Wiener Index die Proben Tiefenstufe 1 (Index 2,24) und S1 [alle Isolate] (Index 2,20) nicht ausreichend differenzieren. Erstere bestand aus 44 Isolaten, die sich auf 18 OTUs verteilten, davon entfielen 43 % auf eine OTU, der Rest verteilte sich nahezu gleichmäßig auf die verbleibenden OTUs. In letzterem Fall dominierten zwei OTUs mit 46 % und 13 % deutlich die Gesamtzahl von 123 Isolaten, die sich auf 26 OTUs verteilten. Die Strukturen beider Proben ließ sich dennoch aufgrund weiterer Indizes voneinander differenzieren, so daß die Probe Tiefenstufe 1 in oben genannte Kategorie B-1 zugeordnet wurde und die Probe S1 [alle Isolate] in die Kategorie C fiel. Verschiedene Indizes beschreiben unterschiedliche Aspekte der Diversität, so daß stets eine Klärung notwendig ist, welcher Aspekt der Diversität mit welchem Index erfaßt wird. Denn, wie Hurlbert (1971), zitiert in Washington (1984), feststellt, kann die Diversität, betrachtet als Funktion der Speziesanzahl und der Abundanz der Verteilung von Individuen auf unterschiedliche Taxa, steigen obwohl die Anzahl der Taxa sinkt, indem die Gleichmäßigkeit der Verteilung von Individuen auf unterschiedliche Taxa zunimmt.

Ausgerechnet der in der Literatur am häufigsten verwendete Diversitäts – Index, der Shannon - Index erwies sich in dieser Untersuchung als der am wenigsten sensitive Indikator für die Diversität des Probenmaterials. Das wesentlich diversere Probenmaterial der molekularen Klonbank erreichte ähnliche Werte für Shannon – Indizes wie die Isolate. Die höchsten Werte für Shannon - Indizes wurden für die Proben mit den größten Anzahlen betrachteter Individuen gefunden: Die Probe „Alle molekularen Klone“ erreichte mit 3,72 den höchsten Shannon – Index dieser Untersuchung, die Probe „Alle Isolate“ folgte auf Rang drei aller betrachteten Proben. Die Diversität letzterer Probe war allerdings, wie alle anderen ermittelten Indizes deutlich auswiesen, weitaus weniger divers als beispielsweise alle weiteren Proben molekularer Klone. Folglich fragt sich, welcher Aspekt der Diversität sich mit dem Shannon –

Index eigentlich messen läßt. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten Indizes ist der Shannon – Wiener Index ein abstrakter Index, dessen biologische Relevanz und Interpretation nicht klar ist (siehe hierzu Washington (1984)). Zudem besteht der Verdacht, daß der Shannon – Wiener Index mit steigender Anzahl der betrachteten Individuen steigt, ohne daß die Diversität der betrachteten Lebensgemeinschaft zunimmt. Zwar wurde anhand der untersuchten Proben lediglich eine lineare Korrelation von 0,61 bzw. eine logarithmische Korrelation von 0,65 zwischen der Anzahl an Individuen einer Probe und dem betreffenden Shannon – Wiener Index festgestellt. Ein einfaches Gedankenexperiment jedoch verdeutlicht, wie empfindlich die Größe des Shannon – Wiener Indexes von der Anzahl betrachteter Individuen abhängen kann. Betrachtet sei eine hypothetische Lebensgemeinschaft von maximaler Diversität: Jedes Individuum gehört einer eigenen OTU an. Das zufällige Ziehen von Proben aus dieser Lebensgemeinschaft sollte also immer dieselbe maximale Diversität messen, unabhängig von der Anzahl der gezogenen Individuen. Der Shannon – Wiener Index liefert jedoch für eine Probe von 10 Individuen 2,3 , für 100 Individuen 4,61 und für 1000 Individuen 6,91, stark unterschiedliche Werte also für eine intuitiv gleichbleibende Diversität.

Aber auch bei alleiniger Betrachtung der anderen Indizes kann die Diversität einer Probe falsch eingeschätzt werden: Hinsichtlich des McIntosh Index waren sich einige der vorgestellten Proben molekularer Klone und Isolate trotz unterschiedlicher Diversität ähnlich. Fazit: Lediglich eine kombinierte Betrachtung mehrerer Indizes führte zu einer korrekten Abschätzung der Diversität von Proben bzw. „Populationen“. Inwiefern sich die Einteilung der Proben in die dargestellten unterschiedlichen Kategorien der Diversität anhand der beschriebenen Indizes verallgemeinern läßt, bedarf weiterer praktischer Evaluierung. Insbesondere wäre zu überprüfen, ob bei sehr kleinen und sehr großen Probenvolumen das Größenverhältnis der Coverage zu den übrigen Indizes nicht so stark entkoppelt ist, daß Fehl kategorisierungen auftreten.

#### **4.2.5.3.2.2 OTU – unabhängige Diversitätsindices**

Watve und Gangal (Watve & Gangal, 1996) weisen darauf hin, daß OTU – basierte Diversitätsindices nicht zwischen einer Probe mit vier OTUs coliformer Organismen und einer Probe von vier weit über die Eubakterien verstreuten OTUs diskriminieren können. Sie weisen darauf hin, daß, obwohl in zweitem Falle die Diversität intuitiv als höher als im ersten Fall einzuschätzen ist, herkömmliche Dissimilaritätsindices für beide Fälle identische Werte liefern. Die Autoren zeigen weiterhin für OTU – basierte Indizes die Gefahr einer starken Abhängigkeit der Höhe des verwendeten Index von dem Niveau, ab welchem bestimmten Kriterien zufolge eine OTU abgegrenzt wird. Um die Schwierigkeiten auszuschließen, die bei willkürlicher Definition von OTUs zwischen verschiedenen Autoren auftreten können, schlagen sie einen Spezies – unabhängigen Diversitätsindex vor. Dieser Index stellt den Mittelwert ( $D_{\text{mean}}$ ) der taxonomischen Distanzen zwischen allen Paaren von Isolaten dar:

$$D_{\text{mean}} = \frac{d(i,j)}{N(N+1)/2}$$

Die Autoren erwähnen, daß eine große durchschnittliche Unähnlichkeit sowohl durch eine kleine Anzahl weit entfernter Organismen mit hoher Abundanz je OTU in der Probe als auch durch eine Vielzahl mäßig nahe verwandter Organismen mit statistischer Verteilung und niedriger Abundanz je OTU gemessen werden kann. Deswegen empfehlen sie als ergänzende Angabe die Varianz der taxonomischen Distanzen. Dabei werden drei Fälle unterschieden:

- (1) Ein großer Wert für  $D_{\text{mean}}$  mit einer niedrigen Varianz weist auf eine diverse Probe mit geringen Abundanzen mäßig verwandter OTUs.
- (2) Ein großer Wert für  $D_{\text{mean}}$  mit einer großen Varianz läßt auf eine hohe Abundanz taxonomisch diverser Organismen schließen.
- (3) Die Dominanz eines einzelnen Biotyps findet in einem kleinen Wert für  $D_{\text{mean}}$  und einer geringen Varianz ihren Ausdruck.

Die Varianz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{n \cdot x^2 - ( \sum x )^2}{n(n-1)},$$

Zur Bestimmung von  $D_{\text{mean}}$  wurde eine Matrix taxonomischer Distanzen aus paarweisem Vergleich aller Individuen ermittelt. Dabei wurden für die molekularen Klone die Distanzen über die *E. coli* - homologen Positionen 240 – 436 berechnet, für DGGE - Banden über die *E. coli* Positionen 342 – 906 und für die teilweise lediglich partiell vorliegenden Sequenzen von Isolaten über die *E. coli* – Positionen 318 – 1075. Lediglich Positionen, an denen ein Nucleotid mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % vorhanden war, wurden in die Berechnung der Distanzmatrizen einbezogen. Eine Korrektur für multiple Substitutionen wurde nach dem Algorithmus von Jukes – Cantor durchgeführt. Da nicht für alle Isolate eine 16S rRNA Sequenzbestimmung vorgenommen wurde, andererseits aber die Abundanz von Sequenzen eines Biotyps einen Einfluß auf die Größe des Index nimmt, wurden für nicht durch Sequenzierung charakterisierte Individuen die 16S rRNA – Gensequenzen der Typstämme der betreffenden OTUs eingesetzt. Da sich Unterschiede in den 16S rRNA – Gensequenzen innerhalb einer OTU deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze der Methode befanden bzw. sich Sequenzen innerhalb einzelner OTUs oft nucleotidgenau glichen, war der Betrag des Fehlers dieser Abschätzung in der Bestimmung von  $D_{\text{mean}}$  höchstwahrscheinlich sehr klein. Folglich dürfte die tatsächlich vorhandene Diversität des Probenmaterials lediglich geringfügig unterschätzt worden sein, d.h. der :  $D_{\text{mean}}$  – Wert für Proben von Isolaten etwas zu gering ausfallen. Um Artefakte bei der Ermittlung und dem Vergleich der  $D_{\text{mean}}$  – Werte durch eine kleine Anzahl sehr diverser Sequenzen zu vermeiden, beschränkte sich der Diversitätsvergleich auf Sequenzen eubakterieller 16S rRNA – Gene. Folglich wurden bei der Berechnung von  $D_{\text{mean}}$  und der Varianz 10 Sequenzen eukaryotischer 18S rRNA – Gene der OTU O und des Isolates V4.MO.03 nicht berücksichtigt. Zahlenwerte für  $D_{\text{mean}}$  und die Varianz von  $D_{\text{mean}}$  sind in Tabelle 30 angegeben.

Folgende Aussagen lassen sich aus den für die Proben ermittelten Indizes von Watve und Gangal treffen:

- Die Diversität, gemessen nach  $D_{\text{mean}}$ , führte zu übereinstimmenden Ergebnissen mit der in Abschnitt 4.2.5.3.2.1 vorgenommenen Einteilung der Proben über OTU – abhängige



Indizes in Kategorien. Für die untersuchten Proben korrespondierte Kategorie A mit hohen Werten für  $D_{\text{mean}}$ , Kategorie B-1 entsprach mäßig hohen Werten für  $D_{\text{mean}}$ , die Kategorien B-2 und C waren im unteren Bereich der Werte für  $D_{\text{mean}}$  angesiedelt. Die Kategorien korrelierten jedoch nicht mit den  $D_{\text{mean}}$  – Werten, wenn Proben betrachtet wurden, die aufgrund taxonomischer Positionen zusammengefaßt wurden.

- Isolate - Proben von Station S1 besaßen eine niedrige Diversität und damit einen niedrigeren  $D_{\text{mean}}$  - Wert als Proben von Station S2. Punkt B war hinsichtlich der Diversität zwischen S1 und S2 angesiedelt. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Prognosen aus den OTU - abhängigen Diversitätsindizes.
- Die Diversitäten der Isolate - Proben, je Fraktion betrachtet, nahmen, den  $D_{\text{mean}}$  – Werten zufolge, in folgender Reihenfolge ab: Gesamtfraktion > freilebende Fraktion > partikelgebundene Fraktion. Für OTU – basierte Indizes ergab sich die davon abweichende Reihenfolge partikelgebundene Fraktion > Gesamtfraktion > freilebende Fraktion.
- Die Diversitäten der Isolate - Proben, je Tiefenzone betrachtet, nahmen in folgender Reihenfolge ab: Tiefenstufe 2 [600 – 700 m] > euphotische Zone [30 – 150 m] > Tiefenstufe 1 [200 – 460 m] > Oberflächenwasser [5 – 10 m]. Für OTU – basierte Indizes wurde die Reihenfolge euphotische Zone > Tiefenstufe 2 > Oberflächenwasser > Tiefenstufe 1 ermittelt. Übereinstimmend wurden die Proben Tiefenstufe 2 und euphotische Zone im Vergleich zu den beiden übrigen Proben als diverser gewertet.
- Die Diversitäten der Isolate - Proben, je Station betrachtet, nahmen in folgender Reihenfolge ab: Station S2 > Punkt B > Station S1. Speziesunabhängige und OTU - abhängige Indizes führten hier zu einer identischen Bewertung.
- Proben aus taxonomisch definierten Gruppen, z.B. Gamma - Proteobakterien oder Bacteroides – Flavobacterium besaßen die niedrigsten für  $D_{\text{mean}}$  gemessenen Werte. Für diese Proben bestanden keine Korrelationen zwischen dem  $D_{\text{mean}}$  –Wert und der Einteilung in eine der oben dargestellten Kategorien. Beispielsweise wurden die Proben *Firmicutes* Niedrig-G+C und *Actinobacteria* der Kategorie A (hohe Diversität) zugeordnet, obwohl sie zu den Proben mit den niedrigsten gemessenen  $D_{\text{mean}}$  Werten gehörten. Grund hierfür war, daß die Individuen dieser Probe in taxonomisch sehr nahe verwandte OTUs untergliedert wurden, z.B. *Bacillus sp.* und *Staphylococcus sp.* für die *Firmicutes* Niedrig-G+C. Das resultierte in hohen Werten für OTU - basierte Diversitätsindizes und suggerierte somit eine Diversität, die sich aufgrund der  $D_{\text{mean}}$  – Werte nicht verifizieren ließ.
- Die Varianzen lieferten tendenzielle Angaben zur Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften. Proben mit taxonomisch eingeschränktem Umfang wiesen, gemäß der Prognose, die niedrigsten Varianzen auf. Die höchsten Varianzen erreichten die sehr diversen Proben aus der Klonbank. Hohe Varianzen – Werte wurden für diverse Proben mit einem oder mehreren Biotypen deutlich erhöhter Abundanz festgestellt, z.B. bei Proben der Klonbank, S2-100 m (hoher Anteil an *Vibrio sp.*), S1-420 m und S2-400 m (beide hoher Anteil *Skeletonema* – ähnlicher Plastidensequenzen) oder bei Proben von Isolat, Tiefenstufe 2 [600 – 700 m] (hohe Abundanzen der OTUs B, O und V) und Filtrat [ $< 1 \mu\text{m}$ ] (hohe Abundanz der OTU B). Aus dem Verhältnis Varianz /  $D_{\text{mean}}$

gebildete Quotienten erlaubten keine expliziten Rückschlüsse auf die Struktur der zugrundeliegenden Probe.

- Alle Proben molekularer Klone wiesen einen höheren  $D_{\text{mean}}$  – Wert auf als Proben von Isolaten. Dieser Vergleich erfolgte unter dem Vorbehalt, daß der für den Sequenzvergleich der Isolate herangezogene Bereich des 16S rRNA – Gens einen ähnlichen Grad der Konservierung aufwies, wie ihn der für die Analyse molekularer Klone benutzte Bereich ebenfalls besitzt, siehe hierzu weiter unten.
- Für DGGE – Banden wurde ein  $D_{\text{mean}}$  von 0,1684 bei einer Varianz von 0,0078 ermittelt. Dieser Wert läßt sich aus dem für den Vergleich Isolate – molekulare Klone aufgeführten Grund nicht mit den anderen aufgeführten  $D_{\text{mean}}$  - Werten vergleichen.

Können OTU – unabhängige Indizes Diversität objektiver beurteilen als von willkürlich definierten OTUs abhängige Indizes ? Das wäre der Fall, wenn die den OTU – unabhängigen Indizes zugrundeliegenden taxonomischen Distanzen weitgehend interpretationsfrei aus Primärdaten abgeleitet werden könnten. Die Wirklichkeit sieht anders aus: Die  $D_{\text{mean}}$  - Indizes beruhten in dieser Untersuchung auf dem Vergleich unterschiedlicher Bereiche der 16S rRNA – Gene. Bedingt durch unterschiedliche Grade der Konservierung einzelner Sequenzbereiche, traten Unterschiede in den Beträgen der  $D_{\text{mean}}$  –Werte und Varianzen in Abhängigkeit von dem jeweils analysierten Bereich der Sequenz auf. Dies soll anhand von  $D_{\text{mean}}$  –Werten, die für den Vergleich von 46 Vollsequenzen mediterraner Isolate ermittelt wurden, demonstriert werden (Da im Vergleich zu den Angaben in Tabelle 30 viele redundante Sequenzen aus diesen Berechnungen herausgelassen wurden, finden sich hier teilweise höhere  $D_{\text{mean}}$  –Werte als die in Tabelle für identische Bereiche angegebenen Werte): Ein Vergleich über die volle Länge genannter Sequenzen ergab einen  $D_{\text{mean}}$  –Wert von 0,1932 bei einer Varianz von 0,0060. Berücksichtigte man nur die Positionen des Sequenzbereiches der molekularen Klonbank, erhielt man für denselben Datensatz einen  $D_{\text{mean}}$  von  $D_{\text{mean}}$  0,1472 und eine Varianz von 0,0049. Der Vergleich über die Positionen der DGGE – Banden ergab einen  $D_{\text{mean}}$  0,2008 bei einer Varianz 0,0067, der Vergleich über den zur partiellen Sequenzanalyse von Isolaten verwendeten Bereich einen  $D_{\text{mean}}$  0,1436 bei einer Varianz 0,0041. Je nach Position und Länge der zur Analyse ausgewählten Bereiche der 16 S rRNA – Gene wurden also unterschiedliche Werte für  $D_{\text{mean}}$  berechnet. Zwar lagen die Indizes im Falle des Vergleiches der Isolate über Partialsequenzen und der molekularen Klonbank hinsichtlich  $D_{\text{mean}}$  und Varianz nahe beinander und erlauben so unter Vorbehalt einen Vergleich beider Datensätze. Aber es wird deutlich, daß dieser speziesunabhängige Index trotz identischem zugrundeliegendem Datenmaterial je nach Interpretation und Auswahl in die Berechnung einbezogener Nucleotidpositionen durchaus variable Werte annehmen kann und somit nicht einen objektiven, generalisierbaren Index darstellt. Der Vergleich verschiedener Indizes, die über unterschiedliche Bereiche eines Genes ermittelt wurden, ist ein Vergleich der Zahlenwerte von Ausprägungen nicht homologer Merkmale. Aus diesem Grund ist die Angabe eines OTU – unabhängigen Index als Maß der Diversität einer Probe nur dann informativ und sinnvoll, wenn gleichzeitig Vergleichswerte für mehrere Biozönosen oder Proben unterschiedlicher Diversität als Referenzen mit angegeben werden.

#### 4.2.5.3.2.3 Korrelationen der Diversitätsindices

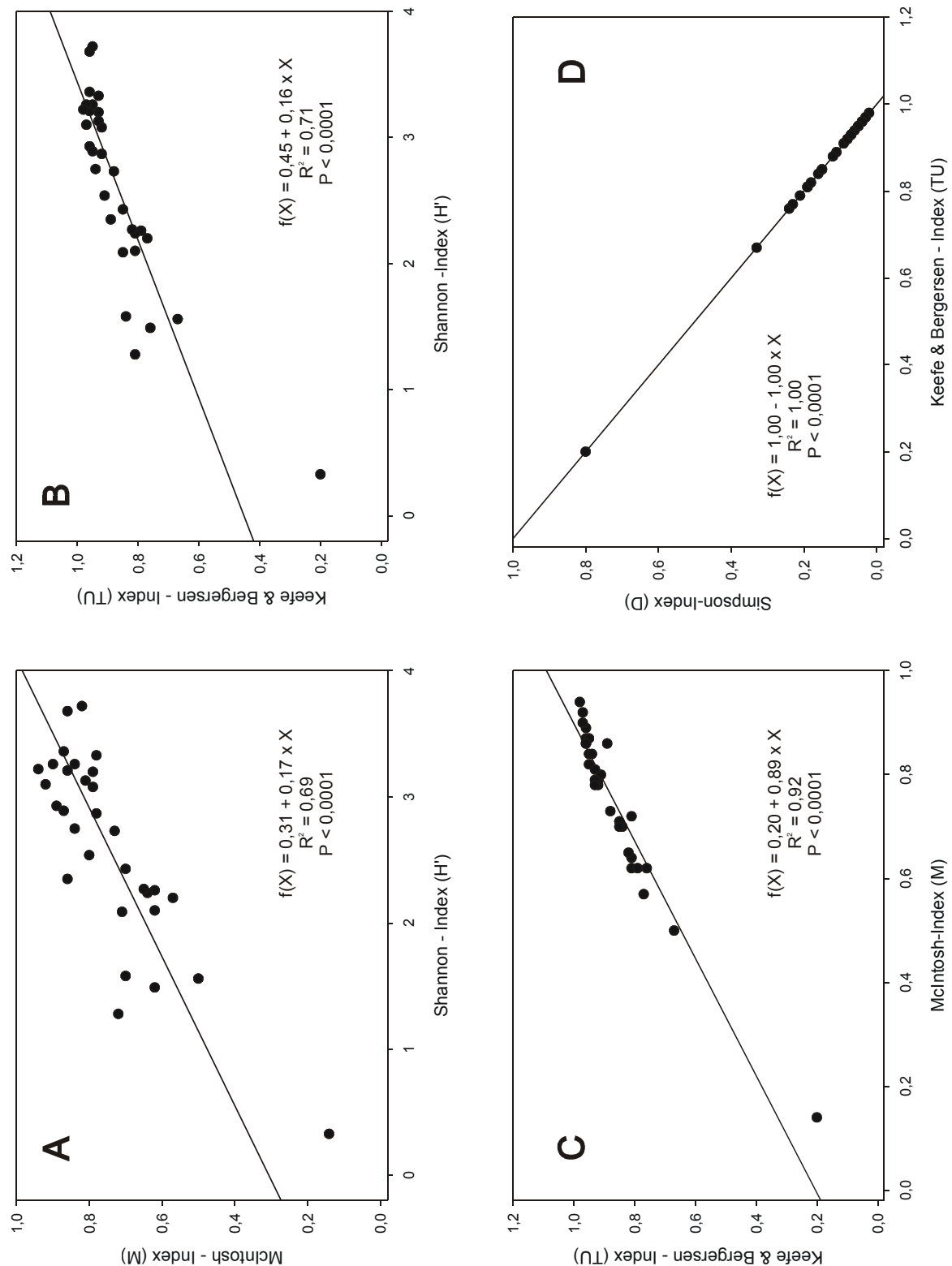


Abbildung 80: Graphische Darstellung der Korrelation einiger in Tabelle 31 aufgeführter Diversitätsindices sowie lineare Regressionsgeraden (angegeben in der Form  $f(X) = y_0 + a \times X$ ). A: Shannon (H') gegen McIntosh (M); B: Shannon (H') gegen Keefe & Bergersen (TU); C: McIntosh (M) gegen Keefe & Bergersen (TU); D: Keefe & Bergersen gegen Simpson (D). Datenpunkte wurden Tabelle 30 entnommen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Um abzuschätzen, in welchem Maße die für alle Proben erhaltenen Diversitätsindizes miteinander korrelieren, wurden lineare bzw. logarithmische Korrelationskoeffizienten für die beschriebenen Indizes errechnet. Diese Korrelationskoeffizienten sind ein Maß für die Unterschiedlichkeit der durch die verglichenen Indizes bezeichneten Aspekte der Diversität. Ein hoher Wert nahe 1 für einen Korrelationskoeffizienten weist auf einen ähnlichen Informationsgehalt der beiden verglichenen Indices hin, ein niedriger Wert zeigt für die verglichenen Indices einen unterschiedlichen Informationsgehalt und ein geringes Maß an Redundanz auf. Wie Tabelle 31 sowie Abbildung 80 entnommen werden kann, verhielten sich Keefe – Bergersens TU und Simpsons D bei einer Korrelation von  $-1$  perfekt komplementär. Um die in den Indizes enthaltene Information zu bekommen, reicht die Berechnung eines der beiden Indizes folglich aus. McIntoshs M und der natürliche Logarithmus von Shannon – Wieners  $H'$  korrelierten mit Simpsons D positiv (M: 0,96,  $H'$ : 0,95) und um die entsprechenden Beträge negativ mit Keefe – Bergersens TU. Deutlich schwächer korrelierte M mit  $H'$  beziehungsweise  $\log H'$ . Watve und Gangals  $D_{\text{mean}}$  korrelierte schwach mit 0,81 zum natürlichen Logarithmus des Shannon – Index und wies zu den anderen Indizes keine Korrelationen auf. Die Coverage C zeigte ebenfalls keine Korrelationen zu einem der anderen betrachteten Indizes und liefert folglich andere Informationen als die übrigen Diversitäts - Indizes.

	Shannon – Index $H'$	McIntosh M	Keefe & Bergersen TU	Simpson D	Watve & Gangal $D_{\text{mean}}$
<b>M</b>	0,829				
<b>TU</b>	0,846	0,961			
<b>D</b>	-0,846	-0,961	-1,000		
<b><math>D_{\text{mean}}</math></b>	0,779	0,533	0,616	-0,616	
<b>C</b>	-0,329	-0,443	-0,360	0,360	-0,528

Tabelle 31: Korrelationskoeffizienten der Diversitätsindizes für die in Tabelle 30 aufgeführten Datensätze von Isolaten und molekularen Klonen.

#### 4.2.5.3.3 Ähnlichkeits – Indices

Ein Vergleich der Ähnlichkeiten verschiedener Proben miteinander wurde durchgeführt, indem zu je zwei Proben die Jaccard und Percentage Similarity (PSC) – Koeffizienten ermittelt und in Matrizen eingetragen wurden. Jaccard – und PSC – Koeffizienten können Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Um eine Angabe in Prozent bezogen auf die jeweilige Grundgesamtheit zu ermöglichen, wurden die ermittelten Werte mit dem Faktor 100 multipliziert. Die Matrizen sind in Tabelle 32 aufgeführt.

ISO: STAT. / MED.	S1 MB	S1 NMS+MeOH	S2 MB	S2 NMS+MeOH	
S1 MB		61,2	34,8	28,6	
S1 NMS+MeOH	5,9		27,5	34,0	
S2 MB	8	8		41,6	
S2 NMS+MeOH	6,1	8,2	11,9		
ISO: FRAKTION	Filtrat [ $< 1\ \mu\text{m}$ ]	Gesamt (unfiltriert)	Retentat [ $> 1\ \mu\text{m}$ ]		
Filtrat [ $< 1\ \mu\text{m}$ ]		56,1	32,3		
Gesamt (unfiltriert)	10,4		41,8		
Retentat [ $> 1\ \mu\text{m}$ ]	9,2	10,6			
ISO: STATION	P B Ergebnis	S 1 Ergebnis	S 2 Ergebnis		
P B Ergebnis		12,0	23,3		
S 1 Ergebnis	4,8		36,4		
S 2 Ergebnis	4,9	7			
ISO: MEDIUM	S1 + S2, MB		S1 + S2, NMS+MeOH		
S1 + S2, MB			48,1		
S1 + S2, NMS	7,9				
ISO: TIEFENSTUFE	OB	EUP	T1	T2	
OB [5 m – 10 m]		38,1	38,2	30,3	
EUP [30 m – 150 m]	6,8		35,9	29,4	
T1 [200 m – 460 m]	8,1	6,8		40,2	
T2 [600 m – 700 m]	6,2	5,2	7,6		
ISO / MC	Gesamt Isolate		Gesamt molekulare Klone		
Gesamt Isolate			7,9		
Gesamt molekulare Klone	0,9				
MC: TIEFE	S1 140 m	S1 420 m	S1 700 m	S2 100 m	S2 400 m
S1 140 m		18,3	21,6	47,7	31,4
S1 420 m	12,0		12,7	22,2	38,2
S1 700 m	13,7	9,1		24,6	19,7
S2 100 m	20,4	13,2	14,8		31,8
S2 400 m	18,6	8,5	16,7	19,6	

Tabelle 32: Matrizen von Ähnlichkeitsindizes. Obere Dreiecksmatrix jeweils PSC; untere Dreiecksmatrix, jeweils Jaccard – Koeffizient. Alle berechneten Werte wurden mit 100 multipliziert um eine Angabe in Prozent an der Grundgesamtheit zu ermöglichen. Für eine Definition der Jaccard – und PSC – Grundgesamtheiten siehe betreffende Formeln. Abkürzungen: EUP, euphotische Zone; ISO, Isolate, MC, molekulare Klone; MED, zur Isolation verwendetes Nährmedium, OB, Oberflächenwasser; S1, Station 1; S2, Station 2; STAT, Station; T1, Tiefenstufe 1; T2; Tiefenstufe 2.

Allgemein galt: Die Jaccard – Koeffizienten lagen deutlich unter den Percentage Similarity (PSC) – Werten. Jaccard - Koeffizienten betrugen beim Vergleich der Isolate unter 10, beim Vergleich der molekularen Klone zwischen 10 und 20. PSC – Werte waren stark variabel und erreichten für Isolate und molekulare Klone Werte zwischen 10 und 60 %. Für die einzelnen Proben wurde festgestellt:

- Im Vergleich der Proben nach Medien und nach Stationen war hinsichtlich des Jaccard – Koeffizienten keine Tendenz festzustellen, ob Proben in Abhängigkeit von der betrachteten Station oder dem betrachteten Isolationsmedium eine größere Ähnlichkeit aufwiesen. Hinsichtlich der PSC – Werte waren sich die Proben identischer Stationen, auf verschiedenen Medien ausplattiert, ähnlicher, als die auf identischen Medien ausplattierten, aber von verschiedenen Stationen stammenden isolierten Bakterien. Bei manchen Proben differierten die Jaccard – und PSC – Werte sehr stark, so beim Vergleich der Proben S1 – MB-Medium und S1 - NMS+Methanol-Medium, bei dem ein Jaccard Koeffizient von lediglich 5,9 aber ein PSC - Wert von 61,2 errechnet wurde. Wenige abundante OTUs trieben so den PSC – Wert in die Höhe, trotz starker Unterschiede bei OTUs mit niedrigen Abundanzen.
- Betrachtete man die Gesamtheit aller isolierten Individuen je Station ohne Berücksichtigung der zur Isolation verwendeten Medien, zeigt der Vergleich zwischen den Stationen S1 und S2 eine höhere Ähnlichkeit als der Vergleich der jeweiligen Station mit den vom küstennahen Punkt B isolierten Stämmen. Hier spielte sicherlich sowohl der extrem küstennahe Standort von Punkt B eine Rolle, als auch Unterschiede in der Methodik der Probennahme zwischen Punkt B einerseits und S1 bzw. S2 andererseits.
- Die Proben aus der freilebenden und der partikelgebundenen Fraktion wiesen jeweils zur Gesamtfraktion eine höhere Ähnlichkeit auf als untereinander.
- Beim Vergleich aller auf MB – Medium und Methanol – supplementiertem Mineralsalzmedium isolierter Stämme trugen 7,9% auf beiden Medien isolierter OTUs zu einer Ähnlichkeit von 48,1 % nach prozentualen Anteilen bei. Der Jaccard – und der PSC – Wert lagen für den Vergleich aller Isolate auf verschiedenen Medien höher als alle im Stationsvergleich ermittelten Werte. Daraus wurde geschlossen, daß der selektive Einfluß verschiedener Medien bei der Isolation, auf den prozentualen Anteil an Individuen bezogen, geringer war, als Unterschiede im Probenmaterial.
- Hinsichtlich der Übereinstimmungen isolierter Stämme in Bezug auf bestimmte Regionen des Wasserkörpers zeigten sich sowohl bei den Jaccard- als auch bei den PSC – Werten keine ausgeprägten Tendenzen. Jaccard – Werte erreichten zwischen 5 % bis 8 %, PSC – Werte zwischen 30 % und 40 %. Aus unterschiedlichen Zonen des freien Wasserkörpers wurden folglich zum großen Teil unterschiedliche Stämme isoliert.
- Die niedrigsten detektierten Jaccard – und PSC – Werte wurden mit 0,9 % bzw. 7,9 % bei dem Vergleich aller Isolate mit allen molekularen Klonen der Klonbank errechnet. Lediglich 4 von 129 OTUs insgesamt waren nach dem 98 % Sequenzidentitätskriterium sowohl bei den Isolaten als auch bei den molekularen Klonen vertreten. Diese vier OTUs gehörten sämtlich zu den Gamma-Proteobakterien und waren den Genera *Vibrio*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* und *Pseudomonas* (*synxantha* – ähnlich) zuzurechnen.
- Bei der Analyse der Ähnlichkeiten von Proben molekularer Klone zeigte sich, daß sich der Betrag entsprechender Jaccard – und PSC – Werte deutlich aneinander annäherte – ein

Indiz für die deutlich gleichmäßigere Verteilung von Individuen auf OTUs im Vergleich zu den Verhältnissen beider Werte bei den Isolaten. Eine klare Tendenz zeigt größere Ähnlichkeiten im Vergleich zwischen Proben verschiedener Stationen, aber vergleichbar tiefen Wasserschichten, z.B. S1 – 140 m und S2 – 100 m (verursacht durch hohe *Vibrio* – Abundanzen) oder auch S1 – 420 m und S2 – 400 m (verursacht durch hohe Abundanzen von Diatomeen – Plastiden). Für den Vergleich aller molekularen Klone von S1 mit den molekularen Klonen von S2 wurde ein Jaccard – Wert von 9,0 % und ein PSC – Wert von 59,9 % ermittelt. Der Jaccard – Wert war der niedrigste für alle molekularen Klone, während der PSC – Wert den höchsten für Vergleiche innerhalb der Klonbank ermittelten Wert darstellte. Die Differenz zwischen Jaccard und PSC – Wert stieg im Vergleich zu den aus einzelnen Wassertiefen der Stationen S1 und S2 entnommenen Proben, ein Hinweis auf eine Abnahme der Diversität und der gleichmäßigen Verteilung von Individuen auf verschiedene OTUs und ein Anzeichen auf ein beginnendes Sättigungsverhalten beim Pickvorgang, d.h. bei erneutem Picken steigt die Wahrscheinlichkeit, eine bereits bekannte OTU zu erhalten.

## **4.3 Direkte                      Untersuchung                      pelagischer Umweltproben**

Ein Teil der Diskussion über die Resultate aus kultivierungsunabhängigen Ansätzen fand schon im Rahmen des Vergleiches der 16S rRNA – Gensequenzen mit den Sequenzen aus Dr. R. Christens Klonbank statt. In diesem Abschnitt werden die folgenden Fragestellungen diskutiert:

- Das Problem der schlechten Kultivierbarkeit: Warum ließen sich lediglich weniger als ein Prozent aller in den Wasserproben vorkommenden Bakterien kultivieren ?
- Einige Anmerkungen zu kritischen Parametern bei der optimierten DNA – RNA – Extraktion.
- Eine Diskussion der gemessenen Nucleinsäurekonzentrationen nebst Vergleich zu Datenmaterial aus der Literatur.
- Ein Vergleich der gemessenen Parameter mit den von anderen Arbeitsgruppen an demselben Probenmaterial erhaltenen Meßwerten. Insbesondere diskutiert werden die Zusammenhänge zwischen dem Datenmaterial aus den kultivierungsabhängigen und kultivierungsunabhängigen Ansätzen.
- Ein Vergleich der verwendeten Fingerprintmethoden, 5S rRNA Profilanalyse, DGGE und SSCP, anhand der erhaltenen Resultate nebst Diskussion von möglichen Fehlerquellen.

### **4.3.1 Bestimmung der Colony forming units (CFUs)**

Ein gewisser Prozentsatz aller Bakterien scheint trotz allem kultivierbar zu sein. Krasser läßt sich der Sachverhalt kaum in Worte fassen, daß sich regelmäßig weniger als 1 % aller im natürlichen Lebensraum vorkommenden Bakterien mit Standardmethoden kultivieren lassen. Auch in dieser Studie erreichte der Prozentsatz an kultivierbaren Bakterien bezogen auf die

mit DAPI – Auszählung ermittelte Gesamtzellzahl nicht einmal 1 %. Das wirft unwillkürlich die Frage auf, ob die kleine kultivierbare Bakterienfraktion tatsächlich die Abundanzen von Mikroorganismen *in situ* widerspiegelt. Wie bereits ausgeführt, müssen bei Gesamtzellzahlen von  $10^8$  bis  $10^9$  Zellen pro Liter Mikroorganismen Abundanzen von mindestens  $10^4$  bis  $10^5$  Zellen pro Liter besitzen, um durch Ausplattierung von 100  $\mu$ l unverdünnter Wasserprobe mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit erfaßt zu werden. Allerdings lassen sich leicht Szenarien erdenken, die deutlich machen, daß eine Abundanz auf CFU – Ebene keine Abundanz auf *in situ* – Ebene reflektieren muß. Abgesehen davon, daß bei einer Inkubation ausplattierter Wasserproben im Dunklen, wie bei dieser Untersuchung geschehen, systematisch gegen photosynthetische Organismen selektiert wird, sei folgendes Beispiel dargestellt: Angenommen, ein Isolat repräsentiert ein Taxon mit einer Abundanz von  $10^6$  Zellen pro Liter und jede Zelle bildet mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:10 eine CFU, während ein „nicht kultivierbares“ Bakterium eine Abundanz von  $10^8$  Zellen pro Liter haben kann, aber nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:10<sup>6</sup> CFUs zu bilden vermag. In 100  $\mu$ l Wasserprobe sind dann mit statistischer Wahrscheinlichkeit 10 Zellen des ersten Taxons zu finden, während man lediglich eine einzige CFU von Taxon 2 auf zehn Platten mit einer möglichen Anzahl von 100 bis 1000 CFUs pro Platte findet. Dementsprechend finden sich auch nur schwache Korrelationskoeffizienten im Vergleich der Datensätze zwischen den verschiedenen Anzahlen CFUs je Fraktion und Medium einerseits, sowie den Gesamtzellzahlen andererseits (Daten und Korrelationskoeffizienten siehe Anhang). Die Korrelationskoeffizienten variieren zwischen 0,31 und –0,36. Auch mit den übrigen im Rahmen dieser Untersuchung von anderen Arbeitsgruppen erfaßten Parametern lassen sich die Anzahlen an CFUs nur schlecht korrelieren. Und selbst im Vergleich der Datensätze der CFU - Zahlen, aufgeschlüsselt nach Fraktionen und Medium ergaben sich nur geringe Korrelationen (Einzige Ausnahmen: Die Anzahlen an CFUs anaerob inkubierter denitrifizierender Bakterien korrelieren stark mit der Leucin – Aminopeptidase Aktivität (Substratkonzentration 150  $\mu$ M); die Korrelationskoeffizienten betragen für die freilebende Fraktion 0,99, für die partikelgebundene Fraktion und für unbehandeltes Meerwasser (Gesamtfraktion) 0,90). Folglich erlaubten die CFU - Zahlen keine Rückschlüsse auf andere erfaßte Parameter und reflektierten deswegen möglicherweise nicht Ereignisse im Ökosystem: Fraglich ist deshalb, ob eine Abundanz der CFUs eine Abundanz der Taxa *in situ* reflektieren könnte. Diese Fragestellung wurde deswegen, ausgehend von identischem Probenmaterial, in dieser Untersuchung und Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen im Rahmen des EMPS – Projektes mit kultivierungsunabhängigen Methoden untersucht.

Auffällig war, daß sich nach Ausplattierung fraktionierter Meerwasserproben die CFU – Anzahlen der Gesamtfraktion und der freilebenden Fraktion (Filtrat < 1  $\mu$ m) einerseits sowie der partikelgebundenen Fraktion (> 1  $\mu$ m) andererseits stark voneinander unterschieden: Die CFU – Zahlen der freilebenden Fraktion (1  $\mu$ M - Filtrat) erreichten jeweils ungefähr 50 % bis 100 % der CFU – Zahlen unbehandelter Meerwasserproben (Gesamtfraktion), während sich aus der partikelgebundenen Fraktion (1  $\mu$ M – Filterretentat) nur ein Bruchteil der CFU – Zahlen isolieren ließ. Über mögliche Erklärungen hierfür kann man nur spekulieren:

- Bakterien der partikelgebundenen Fraktion wachsen generell schlechter und mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit auf Agarplatten heran als Bakterien der freilebenden



Fraktion. Das kann auf physiologische Unterschiede (z.B. unterschiedliche Substratansprüche oder fehlende anaerobe Bedingungen); auf eine mögliche vermehrte Infektion partikelgebundener Bakterien mit lysogenen Viren, welche durch die Veränderungen beim Ausplattieren virulent werden und so das Auskeimen einer höheren Anzahl partikelgebundener Bakterien verhindern oder aber auf Schwierigkeiten bei der Trennung des Retentates vom Filter (z.B. starke Anhaftung) zurückzuführen sein. Selbst folgendes Szenario läßt sich nicht ausschließen: Die Differenz von ca. 50 % der CFU - Zahlen „freilebender“ Bakterien zur Gesamtfraktion entsteht durch das Anheften der Bakterien an Filterretentat, wobei die am Retentat verbleibenden Bakterien durch die harsche Resuspensionsprozedur „unkultivierbar“ geworden sind).

- Die Bakterien der partikelgebundenen Fraktion (Retentat des Filters mit einer Porengröße von 1  $\mu\text{m}$ ) wurden während der Prozedur des Ablösens empfindlich dezimiert (durch Vortexen mit Glasperlen und kurzzeitiger Ultraschallbehandlung). Selbst folgendes Szenario läßt sich nicht ausschließen: Die Prozedur ist unter Umständen ungeeignet, um im Retentat zurückgehaltene Bakterien vom Filter abzulösen. Die Differenz von ca. 50 % der CFU - Zahlen „freilebender“ Bakterien zur Gesamtfraktion entsteht dann möglicherweise durch das Anheften der Bakterien an Filterretentat, wobei die am Retentat verbleibenden Bakterien durch die harsche Resuspensionsprozedur „unkultivierbar“ geworden sind).
- Bakterien, die eigentlich partikelgebunden vorkommen, wurden während des Durchpressens der Wasserprobe durch den Filter von den Partikeln und vom Retentat gespült und werden in der freilebenden Fraktion erfaßt (analog können auch Bakterien der freilebenden Fraktion am Filter oder am Retentat festhaften und dann als partikelgebunden erfaßt werden).

### 4.3.2 Extraktion von DNA und RNA aus Umweltproben

Zu entwickeln war eine Methode zur fraktionierten Isolierung von RNA und DNA aus Umweltproben. Wie schon in Abschnitt 3.2.1 dargestellt, gibt es keine ideale, sondern bestenfalls lediglich eine optimale Methode, bei der sorgfältig abgewogen werden muß zwischen dem Nutzen harscher physikalischer und chemischer Bedingungen zum möglichst vollständigen Zellaufschluß und der Notwendigkeit, bereits suspendierte Nucleinsäuren vor Beeinträchtigungen, hervorgerufen durch eben diese harschen Bedingungen, zu schützen. Fernerhin gilt es, weitere Kriterien bei der Entwicklung und Optimierung eines optimalen Extraktionsprotokolles zu berücksichtigen. An ein optimales Extraktionsprotokoll sollten folgende allgemeine Anforderungen gestellt werden:

- Der **Zellaufschluß** sollte möglichst vollständig verlaufen.
- **Integrität der Extraktionsprodukte:** Nucleinsäuren (besonders die empfindliche RNA, aber auch DNA) sollten möglichst effektiv von schädigenden Wirkungen, z.B. mechanisch (Scherung, Hitze), chemisch (z.B. Phenol) oder enzymatisch (Nucleasen) geschützt werden.
- Die **Ausbeute** an extrahierten Nucleinsäuren sollte möglichst hoch sein.

- **Verwendbarkeit:** Die extrahierten Nucleinsäuren sollten sich erfolgreich als Ausgangsmaterial für weitere molekularbiologische Arbeitsschritte (z.B. PCR, RT-PCR, radioaktive Markierungen) einsetzen lassen.
- Es sollten **ähnliche Extraktionseffizienzen** für verschiedene Spezies erreicht werden.
- Der **Reinheitsgrad der Extraktionsprodukte** sollte ebenfalls möglichst hoch sein. Möglichst effektiv verhindert werden sollte insbesondere die Kontamination extrahierter DNA und RNA mit Substanzen, die bekannt dafür sind, anschließende molekularbiologische Prozeduren zu inhibieren, z.B. Huminsäuren und Uronsäuren.
- **Zeitersparnis:** Die Prozedur sollte sich möglichst zügig und mit möglichst wenig Arbeitsaufwand durchführen lassen. Uneffektive Schritte, die den Arbeitsaufwand steigern und zeitliche Verzögerungen bewirken, ohne die Nucleinsäureausbeute oder den Grad der Reinheit der isolierten DNA und RNA adäquat zu steigern, sollten nicht durchgeführt werden.
- **Ergonomie:** Die Gesundheit und körperliche Integrität des Anwenders soll durch die Anwendung der Prozedur nicht beeinträchtigt werden. Maßnahmen zum Schutz des Anwenders beinhalten beispielsweise die Substitution gesundheitsschädlicher Agenzien oder, wenn keine Alternativen hierzu bestehen, eine möglichst eingeschränkte Verwendung potentiell gefährlicher Agenzien; ferner eine allgemeine Verminderung des Gefährdungspotentials z.B. durch optimierte, einfache Handhabung.
- **Preiswert:** Das zur Extraktion erforderliche Material soll möglichst preiswert sein.

An die allgemeinen Anforderungen schließen sich für die vorliegende Untersuchungen noch einige spezielle Vorgaben an:

- **Fraktionierte Isolierung von DNA und RNA:** Aufgrund der geringen Menge in den Umweltproben enthaltener extrahierbarer Nucleinsäuren einerseits und dem Bedarf an einer möglichst hohen Menge an RNA für LMW - RNA – Analysen andererseits ergibt sich die Notwendigkeit, aus den Umweltproben zunächst die RNA und anschließend fraktioniert die DNA zu isolieren. Eine Extraktion von Gesamtnucleinsäuren mit anschließendem DNase - bzw. RNase - Verdau würde zu hohen Verlusten an Nucleinsäuren führen.
- **Vergleichbarkeit:** DNA und RNA sollten aus identischen Umweltproben stammen, die jeweils identischen Extraktionsprozeduren ausgesetzt waren, um ein Maximum an Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Eine Extraktionsprozedur, die obengenannten Erfordernissen entspricht, wurde entwickelt. Es wurde gezeigt, daß sich RNA und DNA aus demselben Probenmaterial fraktioniert isolieren läßt und ohne weitere Aufreinigung in molekularbiologische Arbeitsschritte einsetzen läßt. Die fraktionierte DNA - RNA Extraktion ist eine relativ schnelle Prozedur, sie enthält so viele Schritte wie nötig und so wenig Schritte wie möglich. Dennoch ist sie etwas arbeitsaufwendiger als eine Extraktion von Gesamtnucleinsäuren bei neutralem pH, bei Verwendung letzterer die jeweils nicht benötigte Nucleinsäurefraktion vor Beginn des Experimentes durch enzymatischen Verdau beseitigt werden kann. Allerdings geht natürlich bei Experimenten mit Gesamtnucleinsäure - Extrakten immer der mit der benötigten Fraktion entnommene Anteil der nicht verwendeten Nucleinsäurefraktion unwiederbringlich verloren.

Deswegen eignet sich ein Arbeiten mit Gesamtnucleinsäureextrakten nur dann, wenn ausreichend, ggf. sogar reproduzierbares Probenmaterial zur Verfügung steht (z.B.: Kulturen, Chemostat). Die fraktionierte DNA - RNA Extraktion findet dagegen ihren Einsatz bei nicht reproduzierbarem Probenmaterial, bei welchem ohnehin nur relativ geringe Mengen extrahierbaren Materials beider Nucleinsäurefraktionen erwartet werden können.

Es wurde gezeigt, daß die gemäß dem entwickelten Protokoll isolierte DNA in PCR - Untersuchungen eingesetzt werden kann. Im Falle der Extraktion aus Stämmen, die im Labor herangezüchtet worden waren, ließ sich DNA ohne weitere Vorkehrungen zur erfolgreichen Amplifikation einsetzen. Die Reinheit der gewonnenen DNA reichte sogar aus, um erfolgreich Gene aus Umwelt - DNA zu amplifizieren, obwohl hier erkennbar war, daß im Ansatz neben der isolierten DNA auch PCR - inhibierende Substanzen zurückgeblieben waren. Denn: Nicht der PCR - Ansatz mit der höchsten eingesetzten DNA - Menge war es, welcher das stärkste Amplifikationsprodukt zeitigte, sondern ein verdünnter Ansatz, in dem zwar die eingesetzte DNA - Menge geringer war (was theoretisch zu einem schwächeren Amplifikationsprodukt führen sollte) aber demgegenüber der hemmende Einfluß PCR - inhibierender Substanzen noch deutlicher abgeschwächt war, so daß insgesamt in einem verdünnten PCR - Ansatz das stärkste Amplifikationsprodukt gebildet wurde. Die mit stärkerer Verdünnung verbundene weitere Abschwächung des PCR - Produktes erklärt sich aus der Proportionalität zwischen eingesetzter DNA - Menge und Menge an amplifiziertem PCR - Produkt. Es ist anzunehmen, daß bei diesen niedrigen Verdünnungsstufen die Abnahme des PCR - inhibierenden Effektes durch kontaminierende Substanzen eine stetig geringer werdende Rolle spielt.

Abzuwägen bleibt, ob sich eine Aufreinigung der DNA lohnt, z.B. durch Behandlung mit Cetyl - Trimethyl - Ammonium - Bromid (CTAB) oder durch eine Aufreinigung über Ionenaustausch - Säulen. Diese Frage läßt sich am sinnvollsten dann klären, wenn man die Erfordernisse der jeweiligen Applikation kennt, für die man die benötigte DNA braucht. Dem Vorteil einer stärker gereinigten DNA stehen die Nachteile zusätzlicher, ggf. hoher Verluste, erhöhtem Zeitaufwand und Mehrkosten gegenüber. Für die in dieser Untersuchung berücksichtigten Applikationen war der Reinheitsgrad der isolierten Nucleinsäuren ausreichend, jedoch können zusätzliche Reinigungsschritte erforderlich werden, wenn mit kontaminierenden Substanzen stärker belastete Standorte, z.B. Böden, untersucht werden. Prinzipiell sind einfache Schritte bei einer Optimierung aufwendigeren Schritten vorzuziehen. Auf diese Untersuchung bezogen heißt das: DNA vor dem Einsatz in die PCR zu verdünnen, ist sicherlich der denkbar einfachste und unaufwendigste Schritt und wurde deswegen als erster Schritt einer Maßnahmenkaskade ausprobiert, um eine erfolgreiche Amplifikation von Genfragmenten aus Umwelt - DNA zu erzielen. Da die PCR - Reaktion gegenüber allen möglichen inhibierenden Substanzen (z.B. Salzkonzentration, pH - Wert, organische Substanzen) relativ empfindlich ist, ist es anzunehmen, daß der Reinheitsgrad der nach diesem Protokoll extrahierten Nucleinsäuren für eine Vielzahl von molekularbiologischen Anwendungen ausreichend ist.

Schließlich bleibt anzumerken, daß DNA, extrahiert nach diesem Protokoll, durch die mechanischen Einflüsse (durch die Mikrodismembrator - Behandlung mit Glaskugeln und die Glassplitterchen der GFF Filter) stark gesichert ist, was die Einsatzmöglichkeiten der so gewonnenen DNA beschränkt (z.B. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Southern Hybridization). Eine weitergehende Beschreibung der Effekte beim Einsatz gescherter DNA in verschiedenen molekularbiologischen Arbeitstechniken findet sich in Leff *et al.* (1995), dort finden sich auch verschiedene alternative Protokolle zur Extraktion weniger stark gescherter DNA aus Umweltproben, die allerdings der Einschränkung deutlich niedrigerer Extraktionseffizienzen unterliegen und damit die Frage nach einer möglichen Extraktionsselektivität implizieren. Für ribosomale RNAs wurde bisher keine Beeinflussung durch Scherkräfte berichtet.

Ribosomale RNA, nach dem in dieser Untersuchung optimierten Protokoll extrahiert, eignet sich ebenfalls zum Einsatz in molekularbiologische Untersuchungen, wie LMW - RNA Analysen und auf RT - PCR basierenden Untersuchungstechniken. In den Experimenten gelang eine Amplifizierung von partiellen 16S RNA Fragmenten mit einer Länge von ca. 450 bis 600 nt, die RT - PCR Amplifikation einer nahezu vollständigen 16S rRNA mit einer Länge von ca. 1500 nt gelang jedoch nicht. Fraglich bleibt, warum eine reverse Transkription eines nahezu vollständigen 16S rRNA - Fragmentes nicht gelungen ist. Offensichtlich wird 16S ribosomale RNA in cDNA zurückgeschrieben, aber der Anteil nahezu vollständiger 16S cRNA - Transkripte scheint zu gering zu sein, um eine Amplifikation nahezu vollständiger 16S rRNA - Genfragmente zu erlauben. Ursache hierfür können sein: Erstens, das einfache Abspringen der Reversen Transkriptase von einem nicht zu Ende rücküberschriebenen RNA - Strang, ein Ereignis, das desto wahrscheinlicher eintreten wird, je länger die zu amplifizierende Sequenz ist; zweitens, modifizierte Nucleotide welche den Einbau eines paarenden Nucleotides im cDNA - Stranges erschweren bzw. verhindern. Für 16S rRNA wurde eine Modifikation der *E. coli* homologen Positionen 966 bzw. 967 berichtet, die zu einem vorzeitigen Abbruch der reversen Translation an dieser Stelle führen Weller *et al.* (1991b). Eine Strategie, die den Einfluß modifizierter Nucleotide auf eine reverse Transkription minimiert - und damit auch eine mögliche Selektivität durch systematische Nichtamplifikation von RNAs mit modifizierten Nucleotiden vermindert -, ist, die reverse Transkription mit Hilfe von Random - Hexameren anstelle von spezifisch bindenden Primern zu initiieren. Random - Hexamere binden unter den verwendeten Bedingungen zufällig an beliebigen Stellen der Template - RNA und dienen somit mit statistischer Wahrscheinlichkeit an jeder Position des RNA - Moleküls als Startmoleküle zur Synthese von cDNAs. Das bedeutet aber auch, daß die Wahrscheinlichkeit, mit der Primer im 3' - terminalen Bereich der 16S RNA binden und somit als Startpunkt zur Synthese einer nahezu vollständigen 16S cDNA dienen, im Vergleich zu allen anderen im Ansatz vorhandenen Bindungsstellen relativ gering ist. Aus diesem Grund und aus den beiden vorgenannten Gründen (einfaches Abspringen oder durch modifizierte Nucleotide verursachtes Abspringen des Enzyms) kann die Menge an synthetisierter nahezu vollständiger 16S cDNA so gering sein, daß eine PCR - Amplifikation eines nahezu vollständigen 16S RNA - Fragmentes nicht möglich ist, während sich partielle Fragmente aus derselben synthetisierten cDNA amplifizieren lassen. Für Analysen mittels DGGE bzw. TGGE ist es ausreichend, Fragmente der 16S RNA mit Längen

von 450 - 600 nt zu amplifizieren, wie es für das in dieser Untersuchung optimierte Protokoll gezeigt wurde. Sollten für bestimmte Fragestellungen RT - PCR Produkte vollständiger 16S RNA benötigt werden, ist eine weitere Optimierung notwendig, die allerdings aus o.g. Gründen weniger bei der Extraktion sondern eher bei einer Optimierung der RT - PCR ansetzen sollte.

Fazit: Die Auswahl der Extraktionsmethode ist abhängig von den Erfordernissen der Methoden, in denen diese DNA eingesetzt wird. Dabei spielt die Fragestellung der Untersuchung eine wichtige Rolle: Maximale Biodiversität ist - aller Erfahrung nach - nur um den Preis gescherter DNA zu erhalten, "sanfte" Methoden bergen immer die Gefahr einer stärkeren Selektivität. Für diese Untersuchung, bei der eine möglichst vollständige Erfassung der Biodiversität angestrebt wird, wird die starke Scherung der DNA in Kauf genommen, nicht zuletzt, weil sich gescherzte chromosomale DNA besser als intakte chromosomale DNA zum Einsatz in PCR - Reaktionen eignet.

### 4.3.3 DNA – und RNA – Konzentrationen aus Umweltproben

Aus den auf 1  $\mu\text{m}$  und 0,2  $\mu\text{m}$  Nucleopore – Filtern aufgebrauchten Zellpellets wurden die DNA – und RNA – Konzentrationen, bezogen auf einen Liter Wasserprobe bzw. je Zelle, bestimmt. Die höchsten gemessenen Konzentrationen an Nucleinsäuren betrugen für DNA  $94,16 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ , für RNA  $812 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ , die niedrigsten gemessenen Werte für DNA  $1,4 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ , für RNA  $0,6 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ . Angaben in der Literatur bewegen sich ebenfalls in dieser Größenordnung: Paul (1985) berichtet für den Golf von Mexico über DNA - Konzentrationen zwischen  $16,5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$  an der Oberfläche und  $0,16 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$  in 1200 m Tiefe. bzw. in (Paul & Carlson, 1984) für verschiedene Probennahmestellen zwischen 8 – 24  $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$  für oberflächennahes Wasser und 0,06 – 1,0  $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$  für ozeanisches Tiefenwasser.

Festgestellt wurde, daß der RNA – Gehalt pro Zelle zwischen Werten von 106,8 fg / Zelle bis 0,6 fg / Zelle schwankt. Der DNA – Gehalt je Zelle variierte ebenfalls von 21,9 fg / Zelle bis zu 0,6 fg / Zelle. Im Durchschnitt enthielt eine einzelne Zelle 22,6 fg RNA und 7,6 fg DNA. Die höchsten Nucleinsäurekonzentrationen pro Zelle wurden in den Wasserproben aus 5 m Tiefe gemessen. Der DNA Gehalt pro Zelle war für Proben aus der freilebenden Fraktion fast immer höher als für Proben aus der partikelgebundenen Fraktion: Das Verhältnis des DNA-Gehaltes pro Zelle der partikelgebundenen im Vergleich zu der freilebenden Fraktion betrug das 1,3 – 8,7 fache. Einzige Ausnahme: Die Probe von S2, 08.04.1995 aus 400 m Tiefe weist ein entsprechendes Verhältnis von 0,07 auf. Das entsprechende Verhältnis für RNA berechnet, zeigt allerdings, daß lediglich in drei von neun Tiefenstufen der RNA – Gehalt pro Zelle für die freilebende Fraktion höher war als der für die partikelgebundene Fraktion; das Verhältnis schwankte zwischen dem 0,05 - fachen und dem 7 - fachen. Vergleiche mit Angaben der Nucleinsäuregehalte in der Literatur (Paul & Carlson, 1984), (Paul *et al.*, 1985), (Simon & Azam, 1989) ergeben, daß der gemessene DNA – Gehalt pro Zelle in der Größenordnung übereinstimmt. Die Werte bewegen sich für Paul (1984) zwischen 5,8 bis

14,4 fg mit einem Schnitt von 9,8 fg / Zelle pro Zelle. Paul (1985) bestimmt einen Schnitt von 5,66 fg pro Zelle an und verweist auf weitere Untersuchungen mit durchschnittlichen DNA – Gehalten von 6,6 fg / Zelle (Kingsbury, 1969) und 7,1 fg / Zelle (McCoy & Olson, 1985). Simon (1989) gibt den DNA-Gehalt pro Zelle für Proben aus der südlichen kalifornischen Bucht zwischen 2,5 und 5,0 fg pro Zelle an. Jeffrey (1996) bestimmt den DNA – Gehalt pro Zelle mit  $5,75 \pm 2,35$  fg pro Zelle.

Auch die RNA – Konzentrationen in den Umweltproben entsprechen in der Größenordnung zum großen Teil Werten aus anderen Veröffentlichungen. Jeffrey et al. (1996) erhielten im Golf von Mexico RNA – Konzentrationen zwischen 60 und  $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Für den RNA Gehalt pro Zelle ermittelten Jeffrey et al.  $9,44 \pm 6,25$  fg Zelle, Lee und Kemp (1994) Werte zwischen 1,6 und 5,4 fg RNA / Zelle, sowie Simon und Azam (1989) zwischen 1,9 und 9,5 fg RNA pro Zelle. Der durchschnittliche Wert von 22,6 fg RNA pro Zelle in dieser Untersuchung liegt zwar deutlich höher als die von den vorgenannten Autoren bestimmten Werte. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß in dieser Untersuchung drei Werte für RNA – Konzentrationen aus Umweltproben im oberflächennahen Wasser deutlich höher lagen, als aus den zugehörigen DNA – Konzentrationen und Zellzahlen zu schließen gewesen wäre. Die Ursache für das „Ausreißen“ dieser drei RNA – Konzentrationen in den 5 m – Proben jeweils einer der beiden untersuchten Fraktionen eines Probennahmetages ist unklar, hat ihre Ursache jedoch nicht in einem Meßfehler, da Messungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen dieser drei Proben übereinstimmende Resultate lieferten. Berücksichtigt man diese extrem hohen RNA – Konzentrationen nicht bei der Bestimmung des RNA – Gehaltes pro Zelle, erhält man statt  $22,6 \pm 21,7$  fg RNA pro Zelle einen Wert von  $10,7 \pm 4,5$  fg RNA pro Zelle, der gut mit den Werten aus anderen Untersuchungen korreliert.

Um die gemessenen DNA – bzw. RNA – Konzentrationen mit anderen Parametern zu korrelieren, die im Verlaufe der Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen anhand des selben Probenmaterials erhoben wurden, wurden lineare Regressionsanalysen der erhaltenen DNA – und RNA – Konzentrationen gegen entsprechende andere Meßwerte durchgeführt. Mit linearen Regressionsanalysen wird durch eine Reihe von Meßwerten eine Gerade nach der Methode der kleinsten Quadrate geführt. Regressionsanalysen dienen dazu, den Zusammenhang zwischen einer abhängigen Variablen und den Werten mindestens einer unabhängigen Variablen darzustellen. Als Konfidenzniveau wurde ein Standardkonfidenzniveau von 95 % angewendet. Bei der Regressionsanalyse wurde für jeden Punkt das Quadrat der Differenz berechnet, die zwischen dem für diesen Punkt berechneten y-Wert und dessen tatsächlichen y-Wert liegt, die Residual - Quadratsumme. Danach wurde die Summe der quadrierten Differenzen, die sogenannte Gesamtsumme der Abweichungsquadrate berechnet, die zwischen den tatsächlichen y-Werten und dem Mittelwert der y-Werte liegen. Zwischen Residual - Quadratsumme und Gesamtsumme der Abweichungsquadrate besteht folgender Zusammenhang: Je kleiner die Residual - Quadratsumme im Vergleich zu der Gesamtsumme der Abweichungsquadrate ist, desto größer ist der Wert des Bestimmtheitsmaßes ( $r^2$ ), das anzeigt, wie gut die aus der Regressionsanalyse resultierende Gleichung die zwischen den Variablen bestehende Beziehung beschreibt. Das Bestimmtheitsmaß resultiert aus einem Vergleich der berechneten mit den tatsächlichen y-

Werten und kann Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei der Wert 1 für die Stichprobe eine vollkommene Korrelation zwischen berechnetem und tatsächlichem y-Wert signalisiert, der Wert 0 dagegen anzeigt, daß die Regressionsgerade ungeeignet ist, einen y-Wert vorherzusagen. Der Wert für r wurde nach folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2][n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Die  $r^2$ -Werte der ermittelten linearen Regressionsgeraden finden sich in Tabelle 33 aufgelistet. Die DNA – bzw. RNA – Konzentrationen beziehen sich auf die je Tiefenstufe addierten DNA – bzw. RNA – Gehalte der  $> 1 \mu\text{m}$  – Fraktion und der  $1 \mu\text{m} > X > 0,2 \mu\text{m}$  Fraktion einer Station an einem Probennahmetag. Nucleinsäurekonzentrationen wurden addiert, da die von anderen Arbeitsgruppen erhobenen Daten nicht auf fraktionierte sondern auf unfraktionierte Wasserproben beziehen und somit partikelgebundene wie auch freilebende Mikroorganismen erfassen.

	DNA		RNA	
	$r^2$	P	$r^2$	P
DNA [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]			0,83	<0,0001
RNA [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,83	<0,0001		
Zellzahl [ $\times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ]	0,69	0,0053	0,77	0,0012
Chlorophyll [ $\times 10^{-2} \mu\text{g Chl x L}^{-1}$ ]	0,87	<0,0001	0,96	<0,0001
Aminosäure – Aufnahme [ $\times 10^{-3} \mu\text{g C x L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,24	0,0199	0,13	0,0955
Glucose – Aufnahme [ $\times 10^{-3} \mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,21	0,0004	0,39	0,0095
Thymidin –Einbaurate [ $\text{pmol x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,92	<0,0001	0,79	0,0004
Leucin –Einbaurate [ $\text{pmol x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,82	0,0002	0,70	0,0015
Phaeophytin [ $\times 10^{-2} \mu\text{g Pheo x L}^{-1}$ ]	0,78	<0,0001	0,76	<0,0001
Leu - 10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,74	0,0008	0,60	0,0053
log Leu – 10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,58	0,0065	0,36	0,0398
Leu – 150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,44	0,0227	0,19	0,1157
log Leu – 150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,38	0,0348	0,15	0,1443
$\beta$ Gluc – 10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,59	0,0056	0,44	0,0223
log $\beta$ Gluc – 10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,78	0,0004	0,34	0,0442
$\beta$ Gluc – 150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,78	0,0004	0,62	0,0041
log $\beta$ Gluc – 150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]	0,63	0,0039	0,44	0,0220
Anzahl CFUs Heterotroph	0,01	0,7291	0,01	0,7281
Anzahl CFUs Methyloolithroph	0,06	0,4630	0,07	0,7844
Anzahl Partikel / L	0,01	0,7269	0,02	0,6332

Tabelle 33: Tabellarische Auflistung der Regressionskoeffizienten ( $r^2$ ) - und Signifikanz – (P) Werte nach linearer Regressionsanalyse von gemessenen DNA – bzw. RNA – Konzentrationen gegen andere Parameter, die in den selben Wasserproben erfaßt wurden. Signifikanzwerte  $< 0,05$  weisen auf signifikante Regressionskoeffizienten hin. Weitere Angaben siehe Text. Weitere Abkürzungen:  $\beta$  Gluc, Beta - Glucosidase – Aktivität; Leu, Leucin – Amino-peptidase – Aktivität; für  $\beta$  Gluc und Leu bezieht sich 10  $\mu\text{M}$  bzw. 150  $\mu\text{M}$  auf die in den Test eingesetzte Substratkonzentration

Lediglich die Übereinstimmung für die Nucleinsäure – Konzentrationen von zwei Kategorien von Meßwerten mit den durch die Regressionsgerade prognostizierten Ergebnissen erreichte  $r^2$ -Werte größer als 0,9. Die RNA – Konzentration zeigte mit einer hohen Signifikanz lineare Zusammenhänge mit dem Chlorophyll – Gehalt. Für den Chlorophyll – Gehalt wurde gegen die RNA – Konzentration ein  $r^2$ -Wert von 0,9627 für die Regressionsgerade mit der Steigung  $y = 0,0598x + 2,8321$  erhalten. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse bei einem positiven Achsenabschnitt von 2,8 zeigt, daß bei einem Chlorophyll - Gehalt der Probe von 0 die RNA – Konzentration ca.  $2,8 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$  beträgt. Ebenso betrug der  $r^2$  – Wert für die Regressionsgerade der DNA – Konzentration gegen die Thymidin – Einbaurate 0,93 bei einer Steigungsgleichung von  $y = 0,0072x - 0,0461$ . Alle anderen  $r^2$ -Werte waren deutlich niedriger als 0,9 und wiesen deswegen deutlich weniger Übereinstimmung mit den durch die Regressionsgerade berechneten y-Werten auf.  $r^2$ -Werte größer als 0,7 ergaben sich bei RNA – Konzentrationen mit DNA – Konzentrationen (0,83), Phaeophytin – Konzentrationen (0,78) und dem Logarithmus der Leucin – Aminopeptidase Aktivität bei einer Substratkonzentration von  $150 \mu\text{M}$  (0,77). Die höchsten  $r^2$ -Werte für DNA – Konzentrationen betrugen 0,83 zu RNA, 0,8 zur  $\beta$  - Glucosidase Aktivität (Substratkonzentration  $150 \mu\text{M}$ , linearer Zusammenhang) und 0,76 zur Leucin - Aminopeptidase Aktivität (Substratkonzentration  $10 \mu\text{M}$ , linearer Zusammenhang).

Um weitere Beziehungen zwischen den Nucleinsäuregehalten und den übrigen gemessenen Parametern festzustellen, wurde mit den Datensätzen eine Berechnung der linearen Korrelationskoeffizienten vorgenommen. Bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten wird der Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen gemessen, die skaliert werden, um unabhängig von den jeweiligen Maßeinheiten zu sein. Die Korrelation der Grundgesamtheit ergibt sich aus der Kovarianz zweier Datensätze, dividiert durch das Produkt aus deren Standardabweichungen. Somit ermöglichen die Ergebnisse der Analyse Aussagen darüber, ob sich zwei Meßreihen gleich entwickeln, d.h. ob hohe Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (positive Korrelation), ob niedrige Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (negative Korrelation) oder ob zwischen den Werten der beiden Datensätze kein Zusammenhang besteht. Die Korrelationskoeffizienten  $\rho$  wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\rho_{n,y} = \frac{\text{Cov}(X,Y)}{\sigma_n \sigma_y}$$

mit

$$-1 \leq \rho_{xy} \leq 1$$

und mit

$$\text{Cov}(X,Y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu_n)(y_i - \mu_y)$$



wobei gilt:

$\sigma$  = Standardabweichung,

$\mu$  = Mittelwert.

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle 34 dargestellt.

	DNA Konz. Fraktion > 1 $\mu\text{m}$	RNA Konz. Fraktion > 1 $\mu\text{m}$	DNA Konz. Fraktion 1 $\mu\text{m}$ > x > 0,2 $\mu\text{m}$	RNA Konz. Fraktion 1 $\mu\text{m}$ > x > 0,2 $\mu\text{m}$	DNA Konz. Frak- tionen addiert	RNA Konz. Frak- tionen addiert
DNA –Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	1	0,81	1	0,71	1	0,91
RNA Konzentration [ $\mu\text{g L}^{-1}$ ]	0,81	1	0,71	1	0,91	1
Zellzahl $\times 10^8 \text{ L}^{-1}$	0,8	0,76	0,78	0,88	0,83	0,89
DNA / Zelle [fg]	0,72	0,51	0,76	0,2	0,59	0,5
RNA / Zelle [fg]	0,55	0,86	0,75	0,96	0,65	0,53
Chlorophyll [ $\mu\text{g Chl x L}^{-1}$ ] $\times 10^{-2}$	0,94	0,87	0,82	0,72	0,91	0,98
Aminosre – Aufnahme [ $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] $\times 10^{-3}$	0,51	0,3	0,58	0,4	0,57	0,43
Glucose – Aufnahme [ $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] $\times 10^{-3}$	0,64	0,41	0,82	0,61	0,78	0,63
Thymidin –Einbaurate [ $\text{pmol x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,86	0,94	0,96	0,82	0,96	0,9
Leucin –Einbaurate [ $\text{pmol x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,83	0,99	0,91	0,74	0,9	0,86
Phaeophytin [ $\mu\text{g Pheo x L}^{-1}$ ] $\times 10^{-2}$	0,86	0,78	0,86	0,66	0,89	0,88
Leu-10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,72	0,84	0,91	0,73	0,88	0,8
log Leu-10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,56	-0,11	0,88	0,16	0,79	0,66
Leu-150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,56	0,69	0,75	0,42	0,71	0,53
log Leu-150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,54	0,36	0,7	0,31	0,67	0,5
$\beta$ Gluc –10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,64	0,9	0,84	0,57	0,8	0,71
log $\beta$ Gluc –10 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,54	-0,24	0,8	-0,16	0,73	0,64
$\beta$ Gluc –150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,74	0,93	0,93	0,7	0,9	0,82
log $\beta$ Gluc –150 $\mu\text{M}$ [ $\text{nmol MU x L}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ]	0,62	-0,18	0,88	-0,06	0,82	0,71
Anzahl CFUs total Heterotroph	0,08	-0,16	0,1	0,01	0,09	-0,09
Anzahl CFUs total Methylo-troph	-0,02	-0,12	0,38	0,19	0,23	-0,09
Partikel $\times \text{L}^{-1}$	-0,3	-0,08	0,27	-0,13	0,11	-0,15

Tabelle 34: Tabellarische Auflistung der linearen Korrelationskoeffizienten nach linearer Regressionsanalyse von gemessenen DNA – bzw. RNA – Konzentrationen gegen andere Parameter, die in den selben Wasserproben erfaßt wurden. Weitere Angaben siehe Text. Abkürzungen siehe Tabelle 33.

Eine Analyse der linearen Korrelationskoeffizienten zeigte einen starken Zusammenhang vor allem der RNA - aber auch der DNA – Konzentrationen mit dem Chlorophyll – Gehalt. Die Korrelation bestand offensichtlich für das Probenmaterial aus allen untersuchten Tiefenstufen. Daraus kann geschlossen werden, daß sich der Chlorophyll – Gehalt des Probenmaterials insbesondere proportional zum RNA – Gehalt aber auch zum DNA – Gehalt verhielt und liefert einen Hinweis darauf, daß ein großer Anteil der physiologisch aktiven Biomasse, aus denen das Probenmaterial bestand, zum Zeitpunkt der Probennahme von der Photosynthese abhing. Dieser Zusammenhang konnte unmittelbar sein, z.B. durch einen sehr hohen Anteil primär photosynthetische Mikroorganismen, oder mittelbar durch Organismen, die sich von den Ausscheidungen oder der Lysis photosynthetisch aktiver Organismen ernährten.

Sehr starke Zusammenhänge bestanden auch zwischen den DNA – und RNA – Konzentrationen einerseits und den Thymidin - und Leucin – Einbauraten andererseits. Die Korrelationskoeffizienten lagen meistens über 0,9. Wenn man die hohen Werte für die RNA – Konzentration und die Leucin – Einbaurate aus der 5 m – Probe von Station S1, 06.04.1995 nicht berücksichtigte, stieg die Korrelation der RNA – Konzentration mit der Leucin - Einbaurate für die freilebende Fraktion ( $1\ \mu\text{m} > x > 0,2\ \mu\text{m}$ ) von 0,74 auf 0,98 (DNA von 0,91 auf 0,98), für die addierten Konzentrationen beider Fraktionen von 0,86 auf 0,99 (DNA von 0,92 auf 0,94), für die partikelgebundene Fraktion blieb die Korrelation für RNA konstant bei 0,99 (DNA steigt von 0,83 auf 0,92). Die Korrelationen der RNA – Konzentrationen mit den Thymidin – und Leucin – Einbauraten waren für die partikelgebundene Fraktion stärker als die entsprechenden Korrelationen der DNA – Konzentrationen. Die Korrelationen der DNA – Konzentrationen mit den Thymidin – bzw. Leucin - Einbauraten waren lediglich dann höher als die entsprechenden RNA – Korrelationen, wenn der 5 m – Meßwert von Station S1, 06.04.1995 in die Analysen mit einbezogen wurde. Die starken Korrelationen des RNA – Gehaltes mit den Einbauraten unter Nichtberücksichtigung des o.g. Wertes sprachen allerdings dafür, diesen Meßwert nicht in die Berechnung der Korrelationskoeffizienten einfließen zu lassen. An der Signifikanz der übrigen Korrelationen änderte sich übrigens nichts nennenswertes, wenn man den entsprechenden RNA – Meßwert aus den Korrelationsberechnungen herausnahm.

Ein ebenfalls ausgeprägter Zusammenhang bestand zwischen den DNA – und den RNA – Konzentrationen der jeweiligen Proben (0,91). Erkennbare Zusammenhänge existierten auch zwischen den Nucleinsäurekonzentrationen und der Gesamtzellzahl (0,83 DNA, 0,89 RNA), dem Phaeophytin – Gehalt (0,89 DNA, 0,88 RNA), der Leucin – Aminopeptidase – Aktivität (Substratkonzentration  $10\ \mu\text{M}$ , linear; 0,88 DNA, 0,8 RNA) und der Beta - Glucosidase Aktivität. (für  $150\ \mu\text{M}$  linear: 0,9 DNA, 0,82 RNA). Interessanterweise korrelierte die Gesamtzellzahl eher mit den RNA – als mit den DNA – Konzentrationen, obwohl eher ein umgekehrter Zusammenhang erwartet wurde. Hingegen schienen die Leucin – Aminopeptidase und Beta – Glucosidase Abbauraten stärker mit den DNA – als mit den RNA – Konzentrationen zu korrelieren. Keine Zusammenhänge waren zwischen dem Nucleinsäuregehalt der Proben und der Anzahl an CFUs sowie der Anzahl der Partikel je Liter Wasserprobe festzustellen.

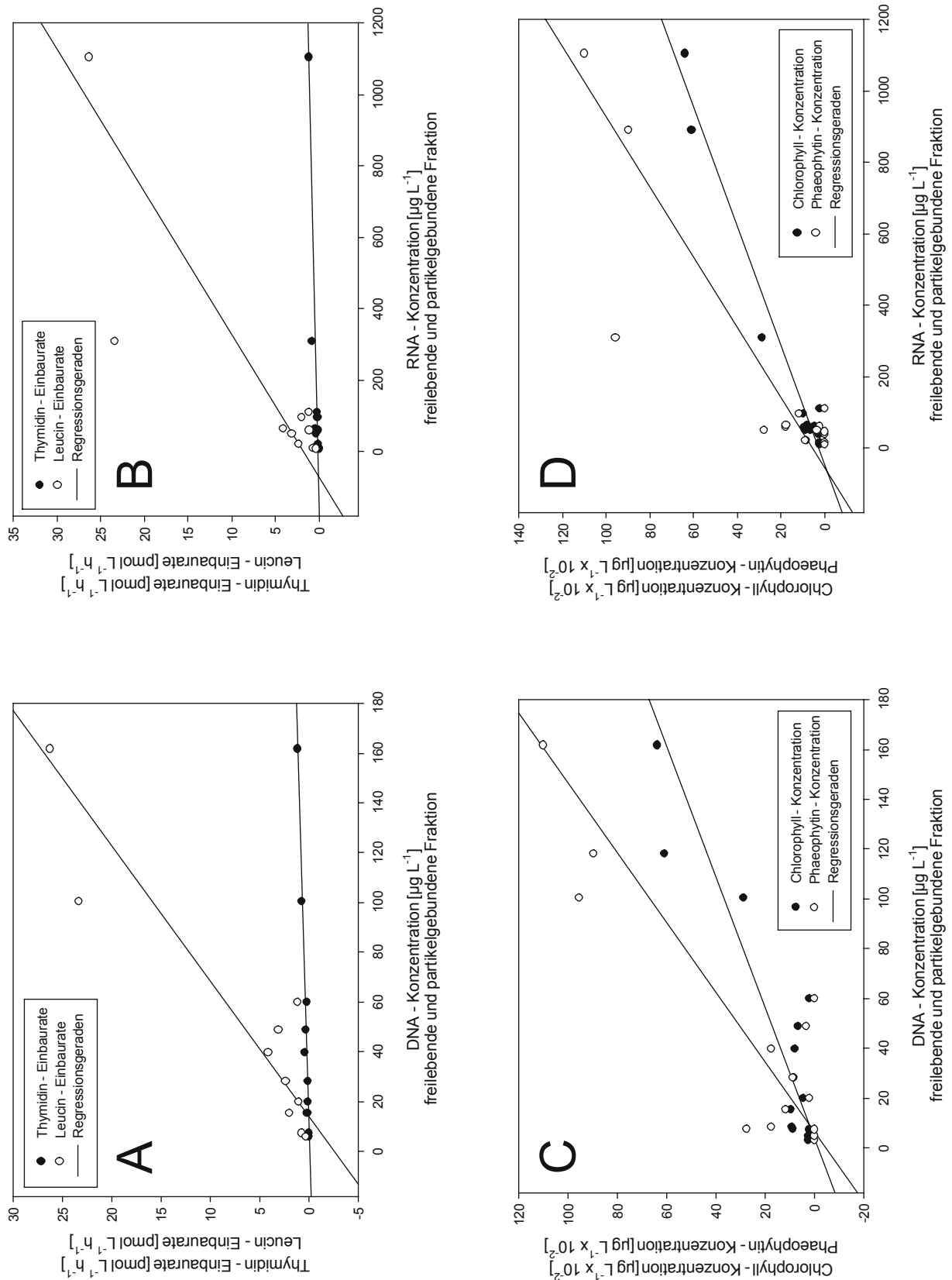


Abbildung 81: Grafische Darstellung der Korrelationen zwischen DNA – und RNA -Konzentrationen mit Enzymaktivitäten von Thymidin – und Leucin – Einbauraten (Diagramme A und B) sowie Chlorophyll - und Phaeophytin - Konzentrationen (Diagramme C und D) in Umweltproben. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 83 und Text. Siehe auch Tabelle 33 und Tabelle 34.

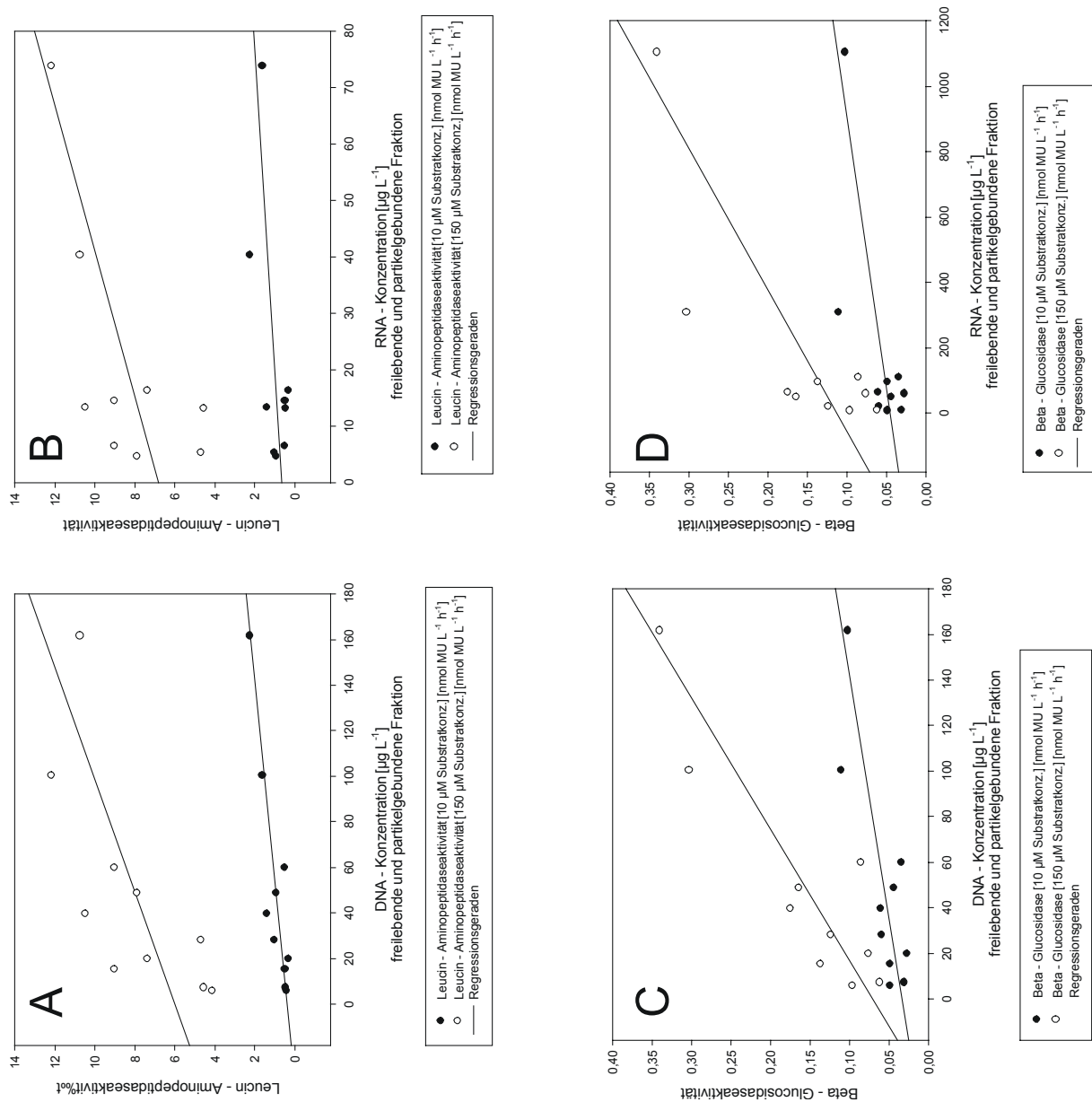


Abbildung 82: Grafische Darstellung der Korrelationen zwischen DNA – und RNA -Konzentrationen mit Enzymaktivitäten von Leucin – Aminopeptidase (Diagramme A und B) und  $\beta$  - Glucosidase (Diagramme C und D) in Umweltproben. Messungen der Enzymaktivitäten wurden bei Substratkonzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Weitere Erläuterungen siehe Abbildung 83 und Text. Siehe auch Tabelle 33 und Tabelle 34.

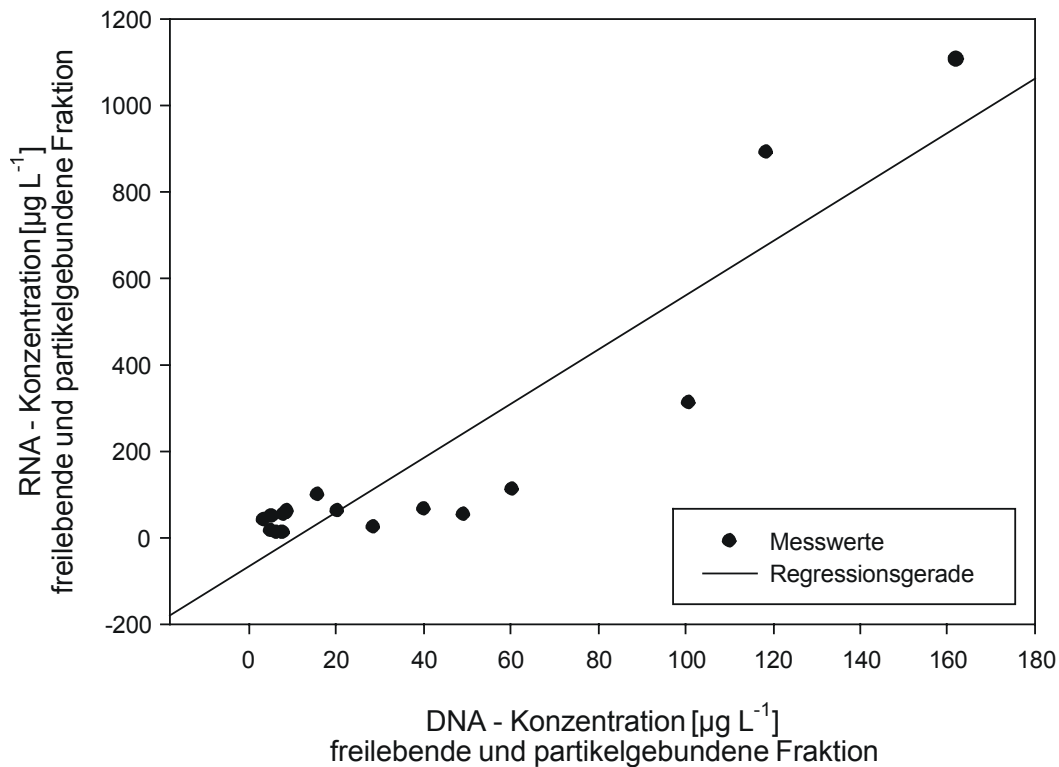


Abbildung 83: Grafische Darstellung der Korrelation zwischen DNA – Konzentrationen und RNA Konzentrationen in Umweltproben. Dargestellt sind die Meßwerte (als Datenpunkte) sowie eine lineare Regressionsgerade. DNA – bzw. RNA – Konzentrationen wurden für freilebende und partikelgebundene Fraktion je Probe in getrennten Messungen ermittelt und deren Konzentrationen anschließend je Station und Tiefenstufe addiert, um die DNA – bzw. RNA – Konzentration unfractionierter Meerwasserproben zu bestimmen. Siehe auch Tabelle 33 und Tabelle 34.

Nicht in der Tabelle aufgeführt sind die linearen Korrelationskoeffizienten für DNA – und Konzentrationen (D-K bzw. R-K) gegen DNA – und RNA – Konzentration pro Zelle (D/Z bzw. R/Z); sie betragen: D-K – D/Z 0,59; D-K – R/Z 0,65; R-K – D/Z 0,50; R-K – R/Z 0,53. DNA Gehalte pro Zelle [fg] zeigten keine ausgeprägten linearen Korrelationen mit anderen Parametern, der stärkste Zusammenhang bestand (bei Addition der DNA – bzw. RNA – Konzentrationen beider Fraktionen der jeweiligen Proben) zur DNA – Konzentration (0,59), zur RNA – Konzentration (0,50), zur Anzahl der CFUs auf MB – Medium (0,50) und zur Aminosäure – Aufnahmerate (0,49). Dagegen waren ausgeprägte Zusammenhänge zwischen dem RNA – Gehalt pro Zelle und Glucose – Aufnahme ( $[\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1} \times 10^{-3}]$ ) (0,93), der Aminosäure – Aufnahmerate  $[\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1} \times 10^{-3}]$  (0,89), dem Phaeophytin Gehalt  $[\mu\text{g Pheo} \times \text{L}^{-1} \times 10^{-2}]$  (0,87), der Leucin – Einbaurrate  $[\text{pmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{h}^{-1}]$  (0,87) und dem  $\log_{10}$  der  $\beta$  - Glucosidase – Aktivität (Substratkonzentration  $10\mu\text{M}$   $[\text{nmol MU L}^{-1} \text{ h}^{-1}]$ ) (0,84) festzustellen.

### 4.3.4 Molekularbiologische Analysen mikrobieller Lebensgemeinschaften

#### 4.3.4.1 Vergleich von 5S rRNA-, DGGE- und LMW-RNA-Profilen

Nucleinsäureextrakte aus Umweltproben wurden mit Hilfe von drei verschiedenen molekularbiologischen Methoden kultivierungsunabhängig untersucht: Mittels Analyse der 5S rRNAs, mittels DGGE - und mittels SSCP - Analyse. Die drei Methoden sollen im Folgenden kurz verglichen werden.

Niedermolekulare RNA – Analysen von RNA – Extrakten aus Umweltproben messen die *in situ* - Abundanz von funktionaler 5S rRNA der in den Umweltproben enthaltenen Taxa. Unter der Annahme, daß der rRNA - Gehalt einer Zelle proportional zu deren physiologischer Aktivität ist, reflektiert das Ergebnis dieser Analyse die physiologische Aktivität einzelner Organismengruppen im Ökosystem. Allerdings ist nicht bekannt, ob der Proportionalitätsfaktor zwischen rRNA - Gehalt und physiologischer Aktivität für alle Organismen konstant ist bzw. sind keine Werte für entsprechende Proportionalitätsfaktoren bekannt.

5S ribosomale RNAs werden größenabhängig aufgetrennt und erlauben prinzipiell eine Quantifizierung der Banden im Bereich zwischen 110 und 130 nt. Die Vorteile sind: Es werden nur *in vivo* entstandene Genprodukte 5S ribosomaler RNA erfaßt. Die Abundanz einzelner Banden reflektiert also direkt die Abundanz der durch diese Banden repräsentierten Organismen im Ökosystem. Verfälschungen treten lediglich durch Unterschiede im refraktären Verhalten verschiedener Spezies bei der Nucleinsäureextraktion sowie durch unterschiedliche Effizienz bei der radioaktiven Markierung der rRNA - Moleküle auf (Dominik, 1997). Nachteile der Methode sind erstens der hohe Materialeinsatz (in dieser Untersuchung wurde die gesamte aus 2 Liter Meerwasser extrahierbare rRNA in die Analyse eingesetzt) sowie zweitens die Tatsache, daß sich 5S ribosomale RNAs taxonomisch verschiedener Spezies in der Größe weitgehend entsprechen und Größen zwischen 110 und 130 nt (meistens zwischen 116 und 124 nt) aufweisen. Somit lassen sich maximal 20 Größenklassen mit dieser Technik unterscheiden. Allerdings werden zur Zeit weitere Optimierungen an der Methode vorgenommen, mit dem Ziel, ausgeschnittene 5S rRNA - Banden sequenzabhängig durch SSCP - Analyse weiter zu trennen, so daß es durchaus möglich ist, bei genügend hohem Probeneinsatz die 5S rRNA - Banden verschiedener Spezies zu quantifizieren (Wenderoth, ). In dieser Untersuchung wurden aufgrund der Beschränkung auf größenabhängige Auftrennung nur geringe Anzahlen einzelner 5S rRNA - Banden erfaßt werden.

DGGE - und SSCP - Analysen hingegen stützen sich auf die Analyse der Abundanz verschiedener 16S rRNA - Gene in den entsprechenden Proben. Ein Unterschied in der SSCP - Analyse gegenüber der DGGE - Analyse besteht in der Struktur der verwendeten Primer. Anforderungen für gute Sequenz - und PCR - Primer sind nach (Rychlik & Rhoads, 1989), (Rychlik, Spencer & Rhoads, 1990):

- hohe Spezifität für die Zielregion und geringe Spezifität für alle anderen Regionen
- keine Ausbildung von Dimeren oder Sekundärstrukturen (Haarnadel - Schleifen)
- Ausbildung stabiler Duplexe mit dem Template unter Bedingungen genügend hoher Stringenz

sowie für PCR - Primer:

- keine Komplementarität am 3'-Ende, die zur Ausbildung von Dimeren oder anderen Artefakten führen und die Ausbeute an PCR - Produkten verringern bzw. das DGGE - Analyseergebnis durch Vortäuschen einer zu hohen Diversität verfälschen.
- eine geringe Differenz der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zwischen dem stabileren und dem weniger stabilen Primer. Effiziente PCR findet bei  $T_m$  - Unterschieden zwischen 20 °C und 25 °C statt, Probleme können bei  $T_m$  - Unterschieden > 35 °C bis 40 °C auftreten.

Die verwendeten Primer zur SSCP - und DGGE- Analyse wurden mit einem Computerprogramm einer entsprechenden Analyse unterzogen (Rychlik & Rhoads, 1989). Dabei ergab sich für den Primer GC-16-F-357 folgender Sachverhalt: Die GC - Klammer besaß offensichtlich einige für PCR - Amplifikationen störende Eigenschaften: Zum einen bildete der Primer am 5' Ende eine Reihe von relativ stabilen Sekundärstrukturen mit sich selbst (Haarnadelschleifen - Bildung), zum anderen wurde durch Komplementarität der 5'-Enden die Ausprägung relativ stabiler Dimere ermöglicht. Der GC-Gehalt des Primers war mit 87 % ungewöhnlich hoch (zum Vergleich: Der zweite in der Amplifikation eingesetzte Primer 16-R-907 besaß einen GC - Gehalt von 35 %) und durch die GC - Klammer wurde eine relativ stabile Paarung am 3'-Ende erreicht - unabhängig davon ob eventuell am 3'-Ende nicht paarende Nucleotide auftraten oder nicht.

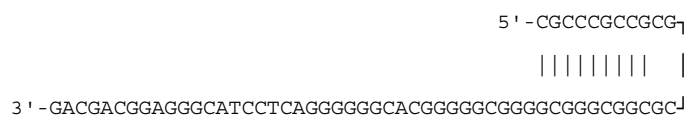
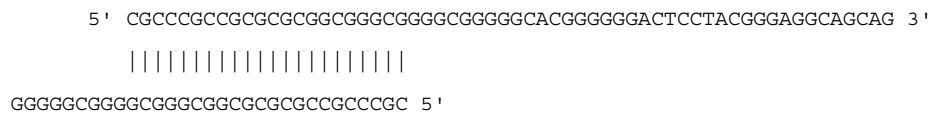
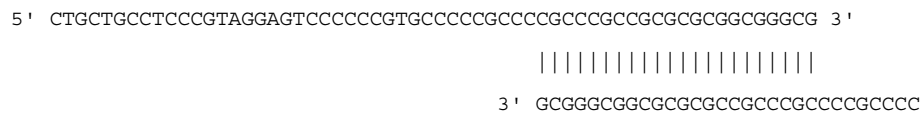


Abbildung 84: Darstellung der Selbstkomplementarität der GC - Klammer nach (Muyzer *et al.*, 1998). Parameter der Haarnadelschleife:  $\Delta G = -21.8$  kcal/mol,  $T_m = 126^\circ\text{C}$

Besonders kritisch erscheint, daß die Positionen 1 bis 22 der GC - Klammer mit sich selbst paarten und somit im - Strang als Primerbindungsstellen fungieren konnten, und dadurch zwei bereits vollständig amplifizierten Genfragmenten eine erneute Verlängerung über das jeweilige 3'-Ende zu Dimeren oder weiteren Nebenprodukten der PCR - Amplifikation hinaus ermöglichen konnten.

**A: Dimerbildung + Strang;  $T_m$  ca. 90 °C:****B: Dimerbildung – Strang,  $T_m$  ca. 90 °C:**Abbildung 85 A und B: Dimerbildung der GC – Klammer nach Muyzer *et al.* (1998).

Die Schmelzpunkte des GC - Primers lagen sehr hoch (in Klammern angegeben zum Vergleich sind die berechneten Werte für den Primer 16-R-907): 116,1 °C (58,5°C) [nearest neighbor method] (Breslauer *et al.*, 1986), (Freier *et al.*, 1986), 105,8 °C (62,1 °C) [%GC Methode] (Rychlik & Rhoads, 1989) bzw. nach der Formel  $[2^\circ\text{C} \times (A/T) + 4^\circ\text{C} \times (G/C)]$  224 °C (54 °C). Die Differenzen in der  $T_m$  - Werten lagen also mit Werten zwischen 43,7 °C und 170 °C um ein erhebliches höher als die kritische Differenz von 35 °C, ab welcher mit Problemen bei der PCR - Amplifikation zu rechnen ist. Selbstverständlich verbietet sich der Einsatz der Primer zu den o.g. Annealing - Bedingungen in der PCR, da beispielsweise die Taq - Polymerase bei 72°C eine optimale Aktivität besitzt und bei oben genannten Temperaturen gekocht worden wäre. Folglich wurde per Computer die optimale Annealing - Temperatur für den Primer GC-16-F-357 bei einer Salzkonzentration von 50 mM auf 72 °C limitiert. Unter den für die PCR genannten chemischen Bedingungen berechnete sich aber die theoretische optimale Annealing - Temperatur für den zweiten verwendeten Primer, ohne GC Klammer, Primer 16-R-907 auf 49,8 °C. Das entsprach einer Differenz in den Annealing - Temperaturen beider in die PCR - Amplifikation eingesetzten Primer von 22 °C. Hinzu kam, daß sich innerhalb der GC – Klammer relativ stabile Sekundärstrukturen ausbilden konnten, deren  $T_m$  erheblich über der optimalen Annealing – Temperatur (Haarnadel - Schleife, Dimere) und dem  $T_m$  des zweiten in die PCR - Amplifikation eingesetzten Primers liegt.

Folglich ist es nicht unwahrscheinlich, daß die PCR - Reaktion bei Verwendung eines Primers mit GC - Klammer erheblich durch PCR - Artefakte beeinflusst wird, wohingegen die SSCP - Amplifikation mit konventionellen Primern um einiges robuster gegenüber Artefaktbildung zu sein scheint. In der Praxis wird das deutlich, wenn man ein Gemisch genomischer DNA verschiedener Spezies amplifiziert und im Vergleich zu einem Gemisch aus jeweils separat amplifizierten PCR - Produkten derselben Spezies in SSCP- bzw. DGGE - Analysen einsetzt. Regelmäßig erscheinen bei PCR - Amplifikationen aus DNA Gemischen bei DGGE - Analysen höhere Bandenzahlen im Vergleich den zu getrennt amplifizierten und erst nach erfolgter PCR - Amplifikation gemischten PCR - Produkten. SSCP - Analysen zeigen hier keine Bildung zusätzlicher Bandenmuster (Daten nicht gezeigt).



Es wird deutlich, daß die Verwendung einer GC - Klammer zur Verbesserung der Auftrennbarkeit von DNA-Strängen (siehe hierzu Sheffield *et al.* (1989)) mit einer Beeinträchtigung der Amplifizierbarkeit einhergeht, die besonders dann zuzunehmen scheint, wenn ein Gemisch zueinander homologer aber voneinander verschiedener Genfragmente amplifiziert wird. Aufgrund obiger Überlegungen scheint die Entstehung der in Absatz 4.3.5 erwähnten Artefakte durch Verwendung von GC - Klammern begünstigt zu werden. Eine Alternative zur Verwendung einer GC - Klammer ist das Klammern der beiden DNA - Stränge mittels eines Psoralen - Derivates (Costes *et al.*, 1993). Über dieses ChemiClamp genannte Psoralen - Derivat können durch UV-Bestrahlung zwei amplifizierte DNA-Stränge kovalent miteinander verbunden werden. Obwohl ein solches Verfahren die Verwendung einer GC - Klammer erspart, schädigt die notwendige UV - Behandlung unter Umständen die Nucleotide des PCR - Amplifikates (z.B. Thymidin - Dimere, etc.). Durch diese Beschädigung der DNA können weitere molekularbiologische Analyseschritte wie z.B. Reamplifikation und DNA - Sequenzierung erschwert bzw. verfälscht werden. Aus diesem Grund wurde diese Methode nicht in vorliegender Untersuchung eingesetzt.

Im Licht der starken Beeinträchtigung der PCR – Amplifikation und der Bildung von Nebenprodukten könnte auch die Erklärung für die Beobachtung liegen, nach Ausschneiden von Banden aus BIS-BAC – DGGE Gelen und anschließender Reamplifikation eindeutige DNA – Sequenzen trotz komplexer Bandenmuster auf Kontroll - DGGE Gelen zu bekommen. Nicht auszuschließen ist, daß es sich bei einigen der Banden aus den erhaltenen komplexen Bandenmustern der Kontroll - DGGE – Gele um Dimere oder Poliere handelt, die neben anderen PCR – Nebenprodukten bzw. Artefakten auftreten. Ausgehend von einem Primer sollte eine Sequenzierungsreaktion, unabhängig davon, ob sich Monomere, Dimere oder Polymere des PCR - Produktes im Reaktionsansatz befinden, eindeutige Sequenzen liefern. In der DGGE – Analyse hingegen würden sich in diesem Falle zahlreiche Banden mit jeweils unterschiedlichem Schmelzverhalten und unterschiedlicher Mobilität finden.

#### **4.3.4.2 Vergleich der Ergebnisse aus DGGE – und SSCP - Analysen**

Anhand der DGGE – und SSCP – Analysen von Isolaten aus Meerwasserproben wurde deutlich, daß sowohl bei der DGGE – als auch bei der SSCP – Analyse zahlreiche Stämme nicht nur eine einzelne, sondern mehrere 16S rRNA – Genfragment - Banden erzeugten. Für Isolate wurden bei der DGGE - Analyse mit dem Primerpaar GC-16-F 357 ↔ 16-R-907 für 29 verschiedene Bakterienstämme insgesamt 56 Banden erhalten, davon waren 41 Banden deutlich ausgeprägt und als Hauptbanden zu werten, bei 15 Banden handelte es sich wohl um PCR - Nebenprodukte. Das entsprach im Schnitt etwa 1,9 Banden bzw. 1,4 deutlich ausgeprägten Banden pro Organismus. Die Banden differierten aber erheblich hinsichtlich ihrer Breite und Schärfe, so daß ein Teil dieser Banden womöglich keine korrekten Amplifikate, sondern Artefakte darstellten. Die SSCP - Analyse mit dem Primerpaar 16-F-530a ↔ 16-R-907 erbrachte für 24 Organismen 53 Banden, davon waren 27 Banden stark ausgeprägt, bei 26 Banden handelte es sich um schwache PCR - Nebenprodukte. Das

entsprach ca. 2,2 Banden bzw. 1,1 deutlich ausgeprägten Banden pro Organismus. Eine Konsequenz aus diesem Befund ist, daß die Anzahl an Banden in DGGE – bzw. SSCP – Gelen nicht die absolute Anzahl an Taxa in der Umweltprobe repräsentiert.

Ein Vergleich der Ergebnisse der DGGE – und SSCP – Analysen der Umweltproben zeigte jedoch Übereinstimmung in wesentlichen Punkten:

- Partikelgebundene Biozönoson unterschieden sich von freilebenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften grundsätzlich. Das wurde auch durch eine 5S rRNA - Profilanalyse bestätigt. Eine Ausnahme hiervon bildete der oberflächennahen Wasserkörper.
- Im oberflächennahen Wasserkörper, besonders im Probenmaterial aus 5 m Tiefe bestanden deutliche Ähnlichkeiten zwischen Proben aus den partikelgebundenen und freilebenden Fraktionen. Weiterhin zeigten die Proben aus oberflächennahen Wasser auch deutliche Unterschiede zu den übrigen Proben der übrigen Fraktionen jeweiliger Tiefenprofile.
- Im Vergleich zwischen den Stationen S1 und S2 schien der Unterschied in der Struktur freilebender mikrobieller Lebensgemeinschaften nur gering zu sein. Partikelgebundene Biozönoson schienen einen konstanten und einen differierenden Anteil zu besitzen.

### **4.3.5 Artefakte bei PCR–Amplifikation und Sequenzierung von Umwelt-DNA**

Artefakte, welche die PCR – Reaktion verfälschen können, sind Amplifikationsfehler durch Einbau falscher Nucleotide, Bildung von Chimären (Genfragment, dessen 5'- und 3'-terminale Teile von verschiedenen Ursprungsmolekülen stammen) (Kopczynski, Bateson & Ward, 1994), (Liesack, Weyland & Stackebrandt, 1991) und Heteroduplexes (Helices, deren DNA – Stränge von verschiedenen Genfragmenten stammen) (Jensen & Straus, 1993), (Myers, Sheffield & Cox, 1989) sowie selektive Amplifikation (Reysenbach *et al.*, 1992), (Silva & Batt, 1995), (Suggs *et al.*, 1981). Im Folgenden sollen mögliche Artefaktbildungen bei den vorgestellten Untersuchungen diskutiert werden.

#### **4.3.5.1 Chimärenbildung und Heteroduplex –Bildung**

Zunächst soll untersucht werden, inwiefern die aus ausgeschnittenen DGGE - Banden erhaltenen 16S rRNA – Gensequenzen tatsächlich lebende Organismen repräsentierten oder mit welcher Wahrscheinlichkeit die erhaltenen Sequenzen Artefakte repräsentieren können. Hierzu ein paar methodische Anmerkungen: Die Bedeutung der Chimärenbildung während der PCR – Amplifikation von 16S rRNA Genfragmenten aus Umweltproben wurde in dieser Untersuchung nicht direkt erfaßt, da kein entsprechender Versuchsaufbau vorgenommen wurde. Eine Abschätzung über das Auftreten von Chimären – und Heteroduplexbildungen kann jedoch nach DGGE - Analyse der PCR - Produkte durch anschließende Sequenzierung ausgeschnittener Banden getroffen werden. Chimärenbildung kann durch eine

Sequenzanalyse überprüft werden. Entsprechende Software wird von dem Ribosomal Database Project (RDP) zur Verfügung gestellt (Maidak *et al.*, 1999).

Eine Analyse der Sequenzen mit Hilfe der erwähnten Software erlaubt keine Aussage, ob eine Sequenz ein chimäres Molekül ist oder nicht, sondern gibt lediglich Aufschluß über die Ähnlichkeiten, daß die 5' - bzw. 3' - terminalen Abschnitte einer DNA Sequenz zu homologen Bereichen verschiedener Organismen aufweisen. Die Methode basiert auf dem Vergleich von Oligomeren (7-meren). Zunächst wird die Anzahl gemeinsamer Oligomere zwischen der zu vergleichenden Sequenz (VS) und der ähnlichsten Sequenz in der Datenbank (DS) bestimmt (nur für Oligomere, die innerhalb einer Sequenz lediglich ein einziges Mal auftreten). Diese Nummer wird als N bezeichnet.

Dann werden für jede zehnte Position (Pos) in der VS zwei Zahlen berechnet:

- N1, die Anzahl an gemeinsamen Oligomeren zwischen der Subsequenz von Position 1 bis zum Punkt Pos (Fragment 1) der VS und der zu Fragment 1 ähnlichsten Sequenz der Datenbank
- N2, die Anzahl an gemeinsamen zwischen der Subsequenz von Position Pos+1 bis zum Sequenzende (Fragment 2) der VS und der zu Fragment 2 ähnlichsten Sequenz der Datenbank

Ist die Summe aus N1 und N2 größer als N ( $N1+N2 > N$ ), dann ist eines der beiden oder beide Fragmente ähnlicher zu einer Sequenz der Datenbank, als die gesamte Sequenz. Je größer die Differenz ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß beide Fragmente nicht von demselben Organismus stammen. Der Output des Programmes ist ein Histogramm mit einem Plot der Werte  $N1 + N2 - N$  für jede zehnte Sequenzposition. Hohe Werte sollten in der Umgebung des Bruchpunktes erreicht werden, niedrigere Werte für entfernt von dem Bruchpunkt gelegene Sequenzpositionen. Ein glockenförmiger Plot ist ein Anzeichen für die chimäre Natur einer Sequenz. Ein eindeutiger glockenförmiger Plot wurde für sechs Sequenzen erhalten. Um zu klären, ob diese Sequenzen tatsächlich chimäre PCR – Produkte repräsentieren, wurden die Sekundärstrukturen der betreffenden Sequenzen überprüft. Ein Vergleich der VS - Fragmente zu den jeweils ähnlichsten Sequenzen unter besonderer Berücksichtigung des Kriteriums der Ausbildung ‚korrekter‘ Sekundärstrukturen führte zu der Einschätzung, daß die VS - Sequenzen tatsächlich existierende Organismen repräsentieren und keine chimären DNA – Moleküle darstellen. Trotzdem kann nicht mit hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß es sich bei den sequenzierten Molekülen nicht doch um Chimären handelt.

Heteroduplexbildung kann ebenfalls durch Sequenzierung ausgeschnittener DGGE – Banden nachgewiesen werden. In diesem Falle sollte eine Sequenzierung mit forward – Primern (in 5'→3' – Richtung des codierenden Stranges) Sequenzen mit Affiliation zu unterschiedlichen Organismen als die mit reverse-Primern erhaltenen Sequenzen aufweisen. Tatsächlich wurde in keinem Falle eine Ausbildung von Heteroduplexen beobachtet. Die Sequenzierung ausgeschnittener DGGE – Banden führte unabhängig von der Leserichtung des sequenzierten Stranges immer zu einer eindeutigen Sequenz.

### **4.3.5.2 Selektive Amplifikation durch Primerselektivität**

Ebenso, wie in Absatz 4.3.5.1 dargestellt, können Aussagen über eine selektive Amplifikation von 16S rRNA Genfragmenten einzelner Organismen nicht aus dem verwendeten Versuchsansatz getroffen werden. Indirekt wurde versucht, amplifizierte 16S rRNA Genfragmente nach DGGE – Analyse und Ausschneiden der Banden mit verschiedenen Primern zu sequenzieren. Eine Amplifikation mit den Primern GC-16-F-357 und 16-R-907 amplifiziert ein ca. 550 bp großes Fragment des 16S rRNA Genes. Es ist möglich mit dem konservierten Forward - Primer 16-F-530a bzw. mit dem korrespondierenden Reverse - Primer 16-R-518 innerhalb dieses Genfragmentes zu sequenzieren und die Ergebnisse mit den Sequenzreaktionen für die beiden erstgenannten Primer zu vergleichen. Sollte eine bevorzugte Amplifikation eines Templates stattfinden, könnte das unter Umständen erkannt werden, wenn die beiden inneren Primer andere Sequenzprodukte als die äußeren Primer erbringen würden bzw. wenn die inneren Primer im Unterschied zu den äußeren Primern trotz passender Bindungsstelle keine eindeutige Sequenz erbringen würden. Eine entsprechende Kontrolle wurde für alle ausgeschnittenen DGGE – Banden mit eindeutig lesbarer Sequenz durchgeführt. In keinem Falle erbrachte eine Sequenzierung mit einem der beiden inneren Primer ein anderes Ergebnis als eine Sequenzierung mit den äußeren Primern. Somit ließen sich hieraus keine Anhaltspunkte für eine präferentielle Amplifikation zumindestens bei der Sequenzierung ableiten.

## **4.4 Welche Organismen sind im Ökosystem abundant ?**

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Untersuchung erhaltenen und eingehend diskutierten Ergebnisse zusammengefaßt und die in den Überschriften der folgenden Abschnitte aufgeworfenen Fragen beantwortet.

### **4.4.1 Reflektiert die Abundanz der Isolate eine Abundanz im Ökosystem ?**

Diese Frage ist nach den bisherigen Analysen zu verneinen. Der Vergleich von Sequenzen aus kultivierungsunabhängigen Analysen (Klonbank Dr. R. Christen (Ruimy *et al.*, 1997), ausgeschnittene DGGE – Banden) mit der Information über die taxonomische Position der Isolate zeigte, daß mit beiden Ansätzen Sequenzen von teilweise sehr unterschiedlichen Organismengruppen gefunden werden. Weder die auf Komplexmedium noch die auf mit Methanol supplementierten Mineralsalzmedien herangezogenen Organismen waren repräsentativ im Vergleich zu den mit kultivationsunabhängigen Ansätzen durch ihre 16S rRNA – Gene repräsentierten Organismen. Dies wird durch den Vergleich der entsprechenden Sequenzen deutlich wie auch durch einen Vergleich der mittels SSCP – Analyse erhaltenen Bandenmuster von Isolat mit denjenigen von Umweltproben.

	Isolate	Klonbank	ausgeschnittene DGGE - Banden
<b>Gamma - Proteobakterien</b>	<b>135</b>	<b>57</b>	<b>0</b>
<i>Pseudoalteromonas</i>	51	4	
<i>Vibrio</i>	9	17	
<i>Alteromonas</i>	5	4	
<i>Colwellia</i>	0	10	
<i>Psychrobacter</i>	20	0	
<i>Acinetobacter</i>	7	0	
<i>Alcanivorax</i> - like	2	0	
<i>Deleya</i>	9	0	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> - like	7	0	
<i>Pseudomonas synxantha</i> - like	3	2	
<i>Marinobacter</i>	10	0	
<i>Methylophaga</i> - like	9	0	
<i>Stentrophomonas</i>	2	0	
<i>Xanthomonas</i>	1	0	
EMBL Z77522 - Gruppe	0	9	
<b>Alpha - Proteobakterien</b>	<b>22</b>	<b>14</b>	<b>3</b>
<i>Roseobacter</i>		1	
<i>Sphingomonas</i> / <i>Erythrobacter</i>	0	0	
<i>Brevundimonas</i>	0	0	
<i>Mycoplana</i>	4	0	
<i>SAR11</i>	0	8	
<b>Delta - Proteobakterien</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	
<b>Cytophaga / Flavobacterium</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	<b>4</b>
<i>OTU V</i>	7	0	
<i>OTU M</i>	3	0	
<i>Cytophaga marinoflava</i> - like	0	7	
EMBL Z77476 - Gruppe	0	5	
EMBL Z77388 - Gruppe	0	4	
<i>Actinobacteria</i>	<b>37</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Firmicutes Niedrig – G+C</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>Planctomyces</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>0</b>
<b>Cyanobakterien / Plastiden</b>	<b>0</b>	<b>67</b>	<b>14</b>
<b>Fungi / Eukaryota</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tabelle 35: Vergleich der absoluten Anzahlen einzelner Taxa in Umweltproben von Stationen S1 und S2, wie durch Kultivierung, Analyse der 16S rRNA Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) sowie Ausschneiden und Sequenzieren von Banden aus DGGE – Gelen erfaßt. Zahlenwerte beziehen sich auf die Summe der Isolate aller beprobten Stationen (S1, S2 sowie, für Isolate, Punkt B).

Sequenzanalysen zeigten, daß lediglich wenige durch kultivierungsunabhängige Sequenzen Ähnlichkeiten > 99 % zu Sequenzen von Isolaten aus demselben Probenahmegebiet waren. Einige taxonomische Gruppen, wie z.B. Planctomyceten, Spirochaeten,  $\delta$  - Proteobakterien und natürlich Cyanobakterien waren nicht unter den Isolaten vertreten. Ähnlichkeiten zu Isolaten bestanden nur für folgende Klone aus Dr. Christens Klonbank: 1-400 C3 (*Vibrio* sp.) zu LMW-RNA OTU C, 1-140 C28 (*Alteromonas macleodii* ssp.) zu LMW-RNA OTU G, und 1-700 C48 (*Pseudomonas* sp.) zu OTU S. Diese Klone gehören sämtlich zu der  $\gamma$  - Subklasse der Proteobakterien. Hinweise, daß Mitglieder des Taxons *Vibrio* einen signifikanten Anteil bakterieller Lebensgemeinschaften in situ bilden können, finden sich auch in Untersuchungen mit auf Extinktionskulturen basierenden Methodiken (Giuliano *et al.*, 1999), (Baxter & Sieburth, 1984). Eine Übersicht, welche Taxa mit welcher Häufigkeit durch welche Methode erfaßt wurde, ist in Tabelle 35 dargestellt.

Eine Analyse der Korrelationskoeffizienten zeigte weiterhin an, daß die CFU - Daten, unabhängig vom verwendeten Isolationsmedium, keine signifikanten Korrelationen mit den übrigen Datensätzen aufwiesen. Weitere Hinweise auf die Selektivität bei der Isolierung von Mikroorganismen liefern auch Berichte über die unterschiedliche Anzahl an isolierten Organismen verschiedener taxonomischer Positionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Mitsui *et al.*, 1997). Außerdem unterschieden sich auch die von verschiedenen Medien isolierten Organismen phylogenetisch deutlich voneinander. Alle diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die isolierten Mikroorganismen nicht die *in situ* abundanten Taxa darstellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang zu den von (Suzuki *et al.*, 1997) und (Fuhrman *et al.*, 1993) publizierten Daten, aber im Widerspruch zu den in einigen anderen Veröffentlichungen gefundenen Resultaten (Pinhassi *et al.*, 1997), (Gonzalez & Moran, 1997) und unterstützt die Hypothese, daß viele marine Taxa zur Zeit als nicht kultivierbar eingestuft werden müssen.

Tatsächlich sind zahlreiche Organismengruppen nur aus 16S rRNA - Gensequenzen molekularer Klone bekannt (Hugenholtz, Goebel & Pace, 1998). Im Rahmen dieser Untersuchung ist das SAR11 – Cluster zu erwähnen (siehe hierzu Abschnitt 4.2.4.4.3), welches, repräsentiert durch molekulare Klone in 16S rRNA Genbanken, seit seiner Entdeckung weltweit detektiert wird (Giovannoni *et al.*, 1990), (Britschgi & Giovannoni, 1991), (Mullins *et al.*, 1995), (Field *et al.*, 1997), (Benlloch *et al.*, 1995), (Bahr, Hobbie & Sogin, 1996), (Zwart *et al.*, 1998), (Crump, Armbrust & Baross, 1999), (Acinas *et al.*, 1999), von dem aber bis heute noch kein Vertreter kultiviert worden ist.

#### 4.4.2 Wie unterscheiden sich freilebende und partikelgebundene mikrobielle Biozönosen ?

Starke Unterschiede waren im Vergleich zwischen den Lebensgemeinschaften der partikelgebundenen und der freilebenden Fraktionen festzustellen. DGGE - , SSCP – und LMW – RNA – Analysen zeigen, daß sich die partikelgebundenen Fraktionen in Bezug auf prägnante und abundante Banden von den Mustern der freilebenden Fraktionen unterscheiden. Lediglich im oberflächennahen Wasser waren, SSCP – und DGGE – Analyse zufolge, gemeinsame abundante Banden in Probenmaterial der freilebenden und partikelgebundenen Fraktion zu finden. Der prägnanteste Unterschied war die hohe Abundanz von 16S rRNA - Genfragmenten mit Affiliation zu Plastiden einzelliger Algen in den Proben der partikelgebundenen, nicht aber der freilebenden Fraktion.

Deutlich zeigte sich auch bei der Betrachtung der Diversitäts – Indizes für Isolate, daß sich partikelgebundene und freilebende Bakterien hinsichtlich der Abundanzen einzelner Taxa unterschieden. Während für die Gesamtheit aller Isolate der freilebenden Fraktion eine hohe Abundanz der OTUs B (45 %, *Pseudoalteromonas sp.*) und K (11 %, *Psychrobacter sp.*) zu verzeichnen war, zeigte sich für die Isolate partikelgebundener Herkunft eine wesentlich gleichmäßigere Verteilung der Individuen auf unterschiedliche OTUs. Die OTUs B und K erreichten hier lediglich 8 % bzw. 7% an der Gesamtzahl aller Individuen. Isolate aus unbehandeltem Meerwasser, der Gesamtfraktion, lagen in der Verteilung der Individuen auf OTUs etwa in der Mitte zwischen den Proben der partikelgebundenen und freilebenden Fraktion: OTU B erreichte hier 24 %, OTU K kam auf 9 % an der Gesamtzahl aller Isolate. Da zahlreiche Taxa nur in geringen Individuenzahlen isoliert werden konnten, war es wegen der hohen Fehlergefahr leider nicht möglich, gesicherte Aussagen darüber zu treffen, welche OTUs ausschließlich oder bevorzugt aus einer der beiden Fraktionen isoliert werden konnten.

Die Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) erlaubte leider keine Aussage hinsichtlich der Fragestellung zur räumlichen Verteilung des Bakterioplanktons. Bei der Probennahme wurden für die Konstruktion der Klonbank jeweils etwa 100 l Meerwasser durch *in situ* Pumpen auf Filter mit 10 µm Porendurchmesser filtriert. Durch Verstopfung der Poren wurde schließlich im Verlaufe der Filtration auf dem Filterretentat auch partikuläres Material mit einem geringeren als dem Porendurchmesser des Filters zurückgehalten. Insofern erlaubt die Analyse der aus Dr. Christens Klonbank (Ruimy *et al.*, 1997) erhaltenen Daten nur Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Gesamtheit der bakteriellen Lebensgemeinschaft, nicht aber, ob bestimmte Taxa bevorzugt partikelgebunden oder freilebend auftraten. Weitere Differenzen in der taxonomischen Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaften partikelgebundener und freilebender Ammonium - oxidierender Bakterien aus Probenmaterial der hier untersuchten Stationen finden sich allerdings in (Phillips *et al.*, 1999).

In Kombination mit den Resultaten aus den SSCP – und DGGE – Analysen läßt sich jedoch der Schluß ziehen, daß zumindest die in der Klonbank detektierten Plastiden einzelliger Algen

aus marinen Partikeln stammten. Die hohe Abundanz der Plastiden in der Klonbank und in den partikelgebundenen Nucleinsäurefraktionen ist ein Hinweis auf Herkunft und Bildungsmodus der marinen Partikel. In der Literatur wurde die zeitliche Sukzession der Partikelbildung aus Phytoplankton detailliert beschrieben: Viele Prymnesiophyten können gelatinöse Kolonieförmigkeiten ausbilden, die schnell absinken und weiteres gelatinöses Material in die Tiefe transportieren (Alldredge & Silver, 1988). Während die Kolonien gesunder, lebendiger Individuen normalerweise bakterienfrei sind, geht die Produktion bakteriozider Substanzen durch die Goldalgen zurück, wenn das Wachstum langsamer wird. In Folge können sich auf dem Mucus Bakterien ansiedeln, die Prymnesiophyten – Kolonien beginnen abzusterben und werden abgebaut. Besonders Prymnesiophyten der Gattung *Phaeocystis* tragen so weltweit erheblich zur Mucusbildung bei (Alldredge & Silver, 1988). In der Nordsee bildeten Prymnesiophyten der Spezies *Emiliana huxley* den dominanten Anteil von partikulärem Material aus einer Sedimentfalle (Cadee, 1985). Auch der Mucus vom Substrat losgelöster Makroalgen kann zur Mucusbildung beitragen (Linley, Newell & Bosma, 1981).

Im Gegensatz zu dem Anheftungsprozeß von Bakterien an Aggregate, bei dem es sich um einen passiven Prozeß handelt, der durch adhäsive Eigenschaften von bakteriellem und partikulärem Mucus vermittelt wird, ist der Anheftungsprozeß von Diatomeen ein aktiver Prozeß unter Beteiligung von Glycoproteinen und findet durch den Einsatz metabolischer Energie statt (Cooksey & Wigglesworth - Cooksey, 1995). Alldredge und Gotschalk (1990) untersuchten marine Partikel unterschiedlicher Herkunft auf ihre Stoffwechselaktivitäten und fanden, daß lediglich Diatomeen – Partikel photosynthetisch aktiv waren und Partikel anderer Herkunft nur einen niedrigen Chlorophyll a – Gehalt aufwiesen. Außerdem wiesen die im Vergleich zu Partikeln anderer Herkunft äußerst zerbrechlichen Diatomeen – Partikel höhere Thymidineinbauraten auf. Nach Alldredge (1990) stellt das Aggregieren von lebenden Diatomeenzellen zu Partikeln eine Antwort auf Nährstoffstress dar. Das Absinken von Diatomeen in tiefere, kältere Wasserschichten kann aber auch eine evolutionäre Strategie sein, mit dem Ziel, die sporenähnlichen Ruhestadien der Diatomeen dem Fraßdruck der euphotischen Zone zu entziehen (Smetacek, 1985), (Smetacek & Pollehne, 1986). Riebesell (1991b) zeigte anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Zusammensetzung mariner Partikel in der Nordsee während der Frühjahrsblüte 1989 die zeitliche Sukzession vom häufigen Auftreten von Diatomeen im freien Wasserkörper und deren Aggregation zu absinkenden marinen Partikeln, gefolgt von Seneszenz, Tod und Verwesung der einzelligen Algen.

Andere Autoren finden ebenfalls Unterschiede in der Struktur zwischen partikelgebundenen und freilebenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften: (Acinas *et al.*, 1999) findet eine deutlich reduzierte Diversität partikelgebundener Bakterien und berichtet über *Alteromonas macleodii* – verwandte Organismen als Hauptvertreter molekularer Isolate der partikelgebundenen Bakterienfraktion in einer 16S rRNA – Klonbank. Substantielle Unterschiede in der Zusammensetzung freilebender und partikelgebundener Fraktionen von Mikroorganismen wurden auch von anderen Autoren berichtet (DeLong *et al.*, 1993), (Bidle & Fletcher, 1995), (Noble *et al.*, 1997).



### 4.4.3 Gibt es Unterschiede zwischen den bakteriellen Lebensgemeinschaften der eutrophen und der oligotrophen Station ?

Mittels kultivierungsunabhängiger Ansätze waren zwischen den mikrobiellen Lebensgemeinschaften der freilebenden Fraktion an den Stationen S2 und S1 keine Unterschiede festzustellen. Unabhängig vom Probennahmetag und der beprobten Station wurden sowohl in der DGGE – als auch in der SSCP – Analyse identische Bandenmuster erhalten. Die partikelgebundenen Bakterienfraktionen wiesen demgegenüber Unterschiede in einem variablen Anteil der Biozönosen auf, während der übrige Teil dieser Fraktion durch alle Proben hindurch konstante Abundanzen besaß. Nur wenige molekulare Isolate aus der Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) zeigten eine stationsspezifische Verteilung, so wurden lediglich an Station S1 gefunden:  $\alpha$  - Proteobakterien :die Gruppe um 1-700 C42 und 1-400 C16,  $\gamma$  - Proteobakterien: die Gruppe um 1-140 C8 (*Pseudoalteromonas sp.*, das korreliert auch mit der Häufigkeit, mit der die LMW-RNA OTU B von Station S1 isoliert wurde). Obwohl molekulare Klone mit Ähnlichkeiten zu LMW-RNA OTU C (*Vibrio sp.*) an beiden Stationen, S1 und S2, gefunden wurden, konnten keine Isolate von OTU C aus Probenmaterial von Station S1 erhalten werden.

Demgegenüber erschien bei Betrachtung der Isolate ein deutlicher Unterschied in der taxonomischen Struktur der Biozönosen zwischen beiden Stationen. An Station S2 wurde eine wesentlich höhere Diversität hinsichtlich der Anzahl an Taxa festgestellt. An Station S1 hingegen bildeten *Pseudoalteromonas sp.* und *Acinetobacter sp.* mit zusammen 60 % den Löwenanteil aller Isolate. Einzelne Taxa waren in ihrem Vorkommen auf eine der untersuchten Stationen beschränkt. Betrachtete man die Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Isolate je Station, konnte man tatsächlich vermuten, daß an unterschiedlichen Stationen unterschiedliche Organismen isoliert wurden. Dagegen lassen sich zwei Punkte anführen:

- Die Resultate aus vorliegender Untersuchung beziehen sich auf zufällig von Agarplatten gepickte Kolonien. Üblicherweise konnte je Agarplatte nur eine geringe Anzahl an Klonen gepickt werden. Ein Rückschluß auf die Abundanz der Gesamtheit der Organismen auf den betreffenden Agarplatten kann deshalb ausdrücklich nicht gezogen werden.
- Bei Betrachtung der Coverage (siehe Abschnitt 4.2.5.1) zeigte sich, daß bei zufälligem Picken von Kolonien die Wahrscheinlichkeit, pro Pickvorgang eine neue OTU zu finden bei getrennter Betrachtung jeder Station höher ist als für die Gesamtheit aller Proben. Die Coverage – Kurve in Abbildung 77 ist eine Sättigungskurve: Je mehr Isolate gepickt wurden, desto geringer war die Wahrscheinlichkeit, eine neue OTU zu finden. Der springende Punkt ist, daß diese Sättigungskurve bei gemeinsamer Betrachtung aller untersuchten Stationen erheblich flacher verlief, als bei getrennter Betrachtung jeder Station, daß die Stationen in dieser Beziehung einander also komplementierten und folglich eine ähnliche Spezieszusammensetzung aufwiesen.
- Die exemplarische Untersuchung der Isolate von OTU H zeigt, daß die vorgenommene Einteilung in OTUs nach Ähnlichkeit der LMW-RNA – Profilmuster und 16S rRNA

Sequenzen sensitiv genug war, um ähnliche Organismen mit vergleichbaren phänotypischen Eigenschaften zu gruppieren. Isolate der OTU H wurden von beiden Stationen, S1 und S2 isoliert und waren phänotypisch zueinander ähnlich und von den nahe verwandten OTUs H\* und H<sup>+</sup> deutlich zu differenzieren.

Die in dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse deuten folglich darauf hin, daß in den beiden voneinander durch die liguro – provencialisische Strömung separierten Wasserkörpern, in denen sich die Stationen S1 und S2 befinden, eine relativ ähnliche Spezieszusammensetzung herrscht.

#### **4.4.4 Verändert sich die taxonomische Struktur mikrobieller Biozöosen mit zunehmender Tiefe ?**

Eine Veränderung der taxonomischen Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften mit zunehmender Tiefe war sowohl mit kultivierungsabhängigen als auch mit kultivierungsunabhängigen Methoden festzustellen, aber die tiefenspezifischen Unterschiede bezogen auf den jeweiligen Tag der Probennahme erschienen bei weitem nicht so ausgeprägt, wie die Unterschiede zwischen den partikelgebundenen und freilebenden Fraktionen innerhalb eines bestimmten Probennahmetages. Kultivierungsabhängig waren klare Zonierungen festzustellen. Einige OTUs wurden bevorzugt oder ausschließlich im oberflächennahen Wasserkörper isoliert, während andere OTUs hauptsächlich im tieferen Wasserkörper abundant waren.

SSCP – Analysen zeigten eine Tendenz auf, daß Proben der freilebenden Fraktion generell relativ ähnliche Bandenmuster erzeugen, während die Bandenmuster der partikelgebundenen Fraktionen wesentlich stärkere tiefenabhängige Unterschiede aufwiesen. Abundante Banden der partikelgebundenen Fraktion, die in der Umgebung der *Agrobacterium tumefaciens* – Markerbande laufen, traten im Allgemeinen im Vergleich der einzelnen Tiefenstufen hinweg konstant auf, während die in der Nähe der *Rhizobium trifolii* und *Flavobacterium johnsoniae* gelegenen abundanten Markerbanden sehr stark in den einzelnen Tiefenstufe variierten. Hieraus wurde geschlossen, daß die freilebende bakterielle Lebensgemeinschaft im untersuchten Wasserkörper eine konstante taxonomische Struktur aufwies, während die partikelgebundene Fraktion einen konstanten Anteil besaßen, aber in dem variablen Teil zahlreiche Änderungen in der Abundanz einzelner Organismen aufweisen konnten. Charakteristische tiefenspezifische Banden wurden in den Fingerprint – Analysen nicht gefunden.

Die Ergebnisse der SSCP –Analyse können als Hinweis darauf gewertet werden, daß sich die Fraktion freilebender Mikroorganismen einer relativ stabilen Zusammensetzung erfreuten, welche unterhalb des Oberflächenwassers keine starken Unterschiede in Abhängigkeit der Tiefe und der Station erkennen ließ. Die partikelgebundene Fraktion bestanden im Untersuchungszeitraum offensichtlich aus einem stabilen Anteil und einem variablen Anteil. Die Banden des stabilen Teiles waren offensichtlich nicht in so starkem Maße tiefen – und

stationsabhängigen Schwankungen unterworfen, wie die Banden des variablen Teiles der Lebensgemeinschaften. Es wurde gezeigt, daß die abundanten Banden des konstanten Anteiles der partikelgebundenen Fraktion aus den Plastiden von *Bacillariophyceae* und *Haptophyceae* gebildet wurden, während einzelne Banden des variablen Anteiles eubakterieller Herkunft waren und den  $\alpha$  - Proteobakterien und dem *Flavobacterium* / *Cytophaga* / *Bacteroides* (FBC) – Phylum zuzurechnen waren. Da die Probennahme zum Zeitpunkt der Frühjahresblüte stattfand, sind die marinen Partikel zu diesem Zeitpunkt anscheinend zu einem Teil aus einzelligen Algen gebildet worden. Da einer der beiden in der DGGE – Analyse eingesetzten Primer lediglich spezifisch für Eubakterien war, wurden bei der Sequenzierung aus ausgeschnittenen DGGE – Banden cytoplasmatische 18S rRNA – Gene der einzelligen Algen nicht gefunden. Aus eben diesem Grund wurden eukaryotische Gene auch nicht in Dr. R. Christens Klonbank gefunden (Ruimy *et al.*, 1997). Unklar ist, ob Plastiden dieser einzelligen Algen aus zum Zeitpunkt der Probennahme lebendigen und physiologisch aktiven Organismen stammten oder aber refraktäre Reste degradierender Algenkörper oder gar Bestandteile des Darminhaltes bzw. fäkale Ausscheidungen von Planktonorganismen wie Copepoden („olivgrüne Zellen“, „olive - green cells“, (Silver & Brland, 1981)) darstellten.

Die deutlichsten Unterschiede in der tiefenabhängigen Verteilung traten zwischen den Proben aus dem unmittelbaren Oberflächenwasser und dem darunterliegenden Wasserkörper auf. Im oberflächennahen Wasser wurde mit Hilfe aller drei eingesetzten Fingerprintmethoden eine wesentlich höhere Diversität nachgewiesen als im darunterliegenden Wasserkörper. Weiterhin waren sich im oberflächennahen Wasser die Bandenmuster der partikelgebundenen und freilebenden Fraktionen sehr ähnlich – im Unterschied zu den Proben aus allen darunterliegenden Wasserschichten. Offensichtlich sind im unmittelbar oberflächennahen Wasserkörper, dem Hauptbildungsort mariner Partikel, die freilebenden und partikelgebundenen Lebensgemeinschaften noch nicht entsprechend voneinander differenziert. Wäre das der Fall, dann müßte man besonders in den oberen Wasserschichten die Ausdifferenzierung mikrobieller Lebensgemeinschaften an langsam absinkenden und alternden Partikeln verfolgen können. Diese Differenzierung erfolgte zum Zeitpunkt der Probennahme offensichtlich relativ schnell: Schon im Probenmaterial aus 80 bis 100 m Tiefe erscheinen die freilebenden und partikelgebundenen Fraktionen voneinander deutlich differenziert.

Bei Betrachtung der tiefenspezifischen Verteilung der Isolate zeigte sich ein gemischtes Bild. Einige OTUs traten spezifisch in verschiedenen Tiefenstufen auf. OTU C (*Vibrio sp.*) zeigte allerdings eine räumliche Präferenz. Isolate dieser OTU wurden lediglich im oberflächennahen Wasser gefunden und konnten nicht in Probenmaterial von Station S1 isoliert werden. Molekulare Isolate dieses Genus hingegen wurden in der Klonbank von Dr. Christen (Ruimy *et al.*, 1997) an beiden Stationen in allen Tiefenstufen gefunden. Obwohl die Gruppe um das molekulare Isolat 1-400 C3 (*Vibrio sp.*) neben der Plastidengruppe 1 um das molekulare Isolat 1-420 C31 (*Skeletonema sp.*) die einzige OTU ist, die in allen untersuchten Tiefenstufen an beiden Stationen gefunden wurde, scheint die Mehrzahl der molekularen Isolate im oberflächennahen Wasserkörper (100 m, 140 m) vorzukommen. Tiefenspezifische

Verteilungen zeigten auch einige weitere taxonomische Gruppen in der Klonbank von Dr. R. Christen, (Ruimy *et al.*, 1997) z.B. die Gruppe um das molekulare Isolat 1-700 C42 ( $\alpha$  - Proteobakterien). Insgesamt zeigten sich bei der Betrachtung der tiefenabhängigen Verteilung unterhalb des Oberflächenwassers lediglich einige geringe Unterschiede, die aber im Vergleich zu den fraktionsspezifischen und in geringerem Maße auch den stationsspezifischen Unterschieden nur gering ausfielen.

Experimentelle Untersuchungen der Abbauleistungen bakterieller Lebensgemeinschaften mit Hilfe eines Hochdruck – Probennahmegerätes (Bianchi & Garcin, 1994) unter Verwendung von D-(U- $^{14}$ C)-Glucose als Substrat zeigten bei verschiedenen Probennahmen, unter anderem auch bei der dieser Untersuchung zugrundeliegenden Probennahme, daß marine Bakterien schon in relativ geringen Tiefen ab ca. 600 m Adaptionen an natürliche Druckverhältnisse zeigten (Bianchi, 1996). Fraglich war, ob diese Anpassung eine Adaption bakterieller Taxa darstellt, die auch im oberflächennahen Wasserkörper eine hohe Abundanz besitzen, oder ob mit zunehmender Tiefe andere, an hohe Druckverhältnisse angepaßte Taxa im Ökosystem abundant sind. DGGE - und SSCP – Analysen zufolge wies die freilebende bakterielle Fraktion in dieser Untersuchung bis zu einer Tiefe von 600 m eine sehr konstante Zusammensetzung auf. Daraus läßt sich folgern, daß entweder eine Adaption an tiefe Umgebungsdrücke besonders seitens des variablen Anteiles der partikelgebundenen Mikrobenfraktion erfolgte, welche entsprechend einen hohen Anteil des gemessenen D-(U- $^{14}$ C)-Glucoseabbaus bewerkstelligt hatte, oder aber, wenn freilebende Mikroorganismen einen hohen Anteil am D-(U- $^{14}$ C)-Glucoseabbau besaßen, daß Psychrophilie zum Teil als „Gewöhnung“ auch im Oberflächenwasser abundanter bakterieller Taxa an hohe Umgebungsdrücke verstanden werden kann. Für letztere Hypothese würde sprechen, daß psychrophile Bakterien keine geschlossene Verwandtschaftsgruppe darstellen, sondern oft Verwandte auch im oberflächennahen Wasserkörper abundanter Genera sind.

Tiefenspezifische räumliche Verteilung von Mikroorganismen, ein Thema, das seinen Weg auch in andere wissenschaftliche Publikationen gefunden hat: Ein Einfluß der Tiefe auf die räumliche Zonierung von Mikroorganismen wird diskutiert in Acinas (1999). Field *et al.* (1997) berichten über die tiefenspezifische Verteilung von Organismen, die zum SAR11-Cluster zu rechnen sind, Gordon (1996) über stratifizierte Lebensgemeinschaften mit Verwandtschaft zu den Genera *Fibrobacter* und *Chlorobium*, Massana (1997) und Murray (1998) über die horizontale Distribution mariner Archaea. Höfle und Brettar (1995) wiesen in dem stratifizierten Wasserkörper der zentralen Ostsee starke tiefenabhängige Veränderungen in den mikrobiellen Biozönosen nach, verursacht durch Unterschiede in den physikalischen und chemischen Parametern der einzelnen Schichten in der stratifizierten Wassersäule. Solch starken Schwankungen, wie von Höfle und Brettar beschrieben, unterlag insbesondere die freilebende Bakterienfraktion infolge des zum Zeitpunkt der Probennahme sehr homogenen Wasserkörpers in dieser Untersuchung nicht. Ältere Untersuchungen über tiefenspezifische Verteilungen von kultivierbaren Mikroorganismen finden sich z.B. in Mitskevich (1980), Mitskevich (1975).

#### 4.4.5 Korrelationen mit physikalischen und chemischen Parametern

Schließlich sollen die erhaltenen Datensätze verglichen werden und versucht werden, Rückschlüsse auf die Vorgänge im Ökosystem zum Zeitpunkt der Probennahme zu ziehen.

Starke Korrelationen bestanden zwischen den Datensätzen der Zellzahl und der Thymidin – bzw. Leucin – Einbaurate (0,91 bzw. 0,87). Das ist ein Hinweis auf eine hohe heterotrophe Aktivität der Zellen zum Zeitpunkt der Probennahme. Die Zellzahl korrelierte weiterhin positiv mit dem RNA – Gehalt (0,89), dem DNA – Gehalt (0,83) sowie ferner mit dem Sauerstoffgehalt, der Leucin – Aminopeptidase - und Beta - Glucosidase - Aktivitäten und negativ mit der Tiefe. Die zuletzt genannten Korrelationen waren allerdings mit Werten zwischen 0,7 und 0,8 bzw. -0,75 nicht sonderlich ausgeprägt. Die Korrelationen der Gesamtzellzahl mit den Gehalten an photosynthetischen Pigmenten, Chlorophyll und Phaeophytin, fielen mit Werten von 0,64 bzw. 0,66 deutlich schwächer aus.

Der Chlorophyllgehalt korrelierte stark mit der RNA – Konzentration (0,98), mit der DNA – Konzentration (0,91) sowie mit den Thymidin und Leucineinbauraten (jeweils 0,87). Der Korrelationskoeffizient des Chlorophyllgehaltes mit dem Phaeophytingehalt betrug 0,81. Chlorophyll- und Phaeophytingehalte korrelierten nur leicht negativ mit der Tiefe mit Koeffizienten von -0,57 bzw. -0,67.

Korrelationen der Nucleinsäuregehalte mit weiteren gemessenen Parametern wurden in Abschnitt 4.3.3 diskutiert. Unerwartet ist die hohe Korrelation der DNA – Konzentration sowie der Gesamtzellzahl mit den Thymidin – und Leucin - Einbauraten. Zu erwarten wäre eine höhere Korrelation der – produktionsabhängigen - RNA – Konzentration mit diesen Parametern gewesen. Hingegen korrelierte der RNA – Gehalt stärker mit der Zellzahl als der DNA – Gehalt. Für diese Beziehung wäre das umgekehrte Resultat zu erwarten gewesen.

Hervorzuheben ist, daß die CFU – Zahlen keine oder nur sehr schwache Korrelationen mit den übrigen, direkt an Umweltproben gemessenen Daten aufwiesen. Einzige Ausnahmen waren die CFU – Zahlen der anaerob inkubierten Denitrifizierer, deren CFU – Zahlen mit den Leucin – Aminopeptidase Aktivitäten stark korrelierten. Auch die Korrelationen der CFU – Zahlen auf verschiedenen Medien sind nicht sehr stark ausgeprägt. CFU – Zahlen erlaubten somit keinen Rückschluß auf andere gemessene Parameter. Weiterhin schienen die auf verschiedenen Medien erhaltenen CFU - Zahlen auch untereinander zum Teil ebenfalls keine Korrelationen aufzuweisen. Korrelationen wurden lediglich zwischen CFU - Zahlen auf folgenden Isolationsmedien erhalten.:

- TSI - Agar, alle Fraktionen untereinander (0,81 - 0,96)
- Denitrifikanten, alle Fraktionen untereinander (0,72 - 0,94)
- TSI - Agar, alle Fraktionen ↔ MB - Agar (> 1 µm) (0,87 - 0,93)
- MB - Agar, unfractioniert ↔ MB - Agar total (0,93)
- NMS - Agar, (> 1 µm) ↔ MB - Agar (>1 µm) (0,9)
- NMS - Agar, alle Fraktionen ↔ TSI - Agar, alle Fraktionen (0,6 - 0,85)

Zusammenfassend bestehen Korrelationen zwischen den folgenden Datensätzen: Thymidin -, Leucin – Einbauraten mit der Gesamtzellzahl und den Nucleinsäuregehalten und dem Gehalt an photosynthetisch aktiven Pigmenten. Diese Datensätze korrelierten insgesamt mehr oder weniger stark ausgeprägt positiv mit dem Sauerstoffgehalt und negativ mit der Tiefe und der Salinität. Keine Korrelationen bestehen zu den CFU - Zahlen.

#### **4.4.6 Was spielte sich im Ökosystem ab ?**

Die im Rahmen dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf die Prozesse zu, die im frühen April 1995 an den Probennahmestellen abliefen.

- Photosynthetisch aktive Organismen bildeten einen signifikanten Anteil an den untersuchten mikrobiellen Biozönosen. Insbesondere waren eukaryotische einzellige Algen ein Bestandteil der zu diesem Zeitpunkt untersuchten marinen Partikel.
- Infolge der starken Primärproduktion und dem in Folge entstandenen Output leicht verwertbarer Nährstoffe (Exsudate bzw. Cytoplasma lysierter Zellen) entwickelte sich eine ausgeprägte mikrobielle heterotrophe Aktivität. Diese Aktivität manifestierte sich in den Datensätzen anhand positiver Korrelationen der gemessenen Exoenzymaktivitäten und Thymidin - bzw. Leucin - Einbauraten.
- Das Absinken entstandener Partikel sorgte für einen Netto - Export der entstandenen Nährstoffe in tiefere Wasserschichten. Partikelgebundene und freilebende mikrobielle Fraktionen wiesen unmittelbar an der Wasseroberfläche bis zu einem gewissen Grad gemeinsame taxonomische Strukturen auf. An der Oberfläche war auch die höchste Diversität der Proben festzustellen. Das Absinken der Partikel unter die euphotische Zone führte jedoch relativ rasch zu einer Differenzierung der freilebenden und partikelgebundenen mikrobiellen Fraktionen.
- Plastiden einzelliger Algen waren auch weit unterhalb der euphotischen Zone nachzuweisen. Ob diese Plastiden refraktäre Bestandteile der Partikel darstellen oder ob die in die Partikel eingeschlossenen einzelligen Algen noch intakt und lebendig waren, konnte in dieser Untersuchung nicht geklärt werden.

#### **4.5 Schlußwort**

In dieser Untersuchung wurde deutlich, wie weit wir heute davon entfernt sind, Organismen zu kennen und zu verstehen, die im marinen Ökosystem abundant sind und an maßgeblichen Stoffumsätzen im Meer beteiligt zu sein scheinen. Kultivierbare Vertreter aus den untersuchten Meerwasserproben fallen zwar zum Teil in bereits beschriebene Genera, weisen aber offensichtlich neben genetischen auch deutliche phänotypische Unterschiede zu den bereits beschriebenen Stämmen der entsprechenden Gattungen auf. Lassen sich kultivierbare Vertreter zumindestens im Labor hinsichtlich ihrer stoffwechselphysiologischen Leistungen charakterisieren, so versagen phänotypische Beschreibungsmaßnahmen bei der großen Anzahl an Mikroorganismen, die sich einer Kultivierung bislang erfolgreich entzogen haben, die aber durch Analysen von 16S rRNA Genen in Umweltproben bereits nachgewiesen wurden. Über

deren phänotypische Eigenschaften, deren physiologische Fähigkeiten und deren ökologische Rolle lassen sich derzeit nur Spekulationen anstellen. Mit den in den letzten 25 Jahren entwickelten Methoden zur Sequenzanalyse und der computergestützten Auswertung von Sequenzdaten besteht für die Mikrobiologen nun die Möglichkeit zur Bestandsaufnahme: Die Fragen, welche Organismen zu welcher Zeit an welchem Ort in welchem Ökosystem auftreten, können nun durch Analysen beantwortet und durch Experimente verifiziert werden. Aber eine Analyse der 16S rRNA Gene beantwortet nur die Fragen nach der taxonomischen Position der bislang nicht kultivierten Organismen, erlaubt aber nur selten Rückschlüsse auf phänotypische Merkmale, physiologische Fähigkeiten oder ökologische Strategien. Diese Rückschlüsse können gezogen werden, indem nach erfolgter Bestandsaufnahme, welche Organismen im Ökosystem vorkommen, ein Zirkelschluß erfolgt und diese Organismen gezielt im Ökosystem gesucht werden, ihre räumliche und zeitliche Verteilung bestimmt wird und der Versuch unternommen wird, Vertreter dieser bis dato unkultivierten Organismen gezielt anzureichern, zu isolieren und schließlich phänotypisch zu charakterisieren. Kenntnisse über Abundanz und physiologische Eigenschaften dieser Organismen würden wiederum genauere Abschätzungen über die von diesen Organismen katalysierten Stoffumsätze und schließlich umfassende Vorhersagen über Stoffkreisläufe im Ökosystem ermöglichen. Andererseits ist es auch erforderlich, zu bestimmen, inwiefern die Umgebungsfaktoren die Ausbildung mikrobieller Gemeinschaften und Anzahl wie Abundanz der diese Biozönosen konstituierenden Taxa bestimmt.

Bakterien waren die ersten Bewohner der Weltmeere und haben sich im Verlaufe der Evolution in vielfältiger Weise an die Gegebenheiten dieses heterogenen Lebensraumes angepasst. Auf mikrobieller Ebene findet eine Vielzahl von Stoffumsätzen statt, die einer bislang nicht erfaßten Anzahl verschiedener bakterieller Spezies eine Koexistenz erlauben, insbesondere weil durch permanente Veränderungen physikalischer Parameter im Ökosystem das zahlenmäßige Verhältnis einzelner mikrobieller Taxa zueinander offenbar keinen Gleichgewichtszustand erreicht. Relativ hohe Nährstoffkonzentrationen im marinen Ökosystem existieren nur in zwei schmalen Bereichen, dem Oberflächenwasser als hauptsächlichem Ort des atmosphärischen und terrestrischen Nährstoffeintrages sowie der unmittelbar über dem Sediment angrenzenden Wasserschicht. Der Bereich dazwischen ist der Bereich der Spezialisten und Hungerkünstler: Nährstoffeintrag findet oft nur durch Absinken von Partikeln aus dem Oberflächenwasser statt und Bakterien im Tiefenwasser müssen sich mit dem begnügen, was die Vorkonsumenten im darübergelegenen Wasserkörper von den alternden Partikeln übriggelassen haben. Die vorliegende Arbeit vermittelte einen Eindruck von den grundsätzlichen Unterschieden in der taxonomischen Struktur freilebender und partikelgebundener Organismen. Diese Unterschiede reflektieren auch sicherlich Unterschiede in der Physiologie und der ökologischen Strategien der beteiligten Taxa. Eine Aufklärung solcher Unterschiede setzt allerdings die Entwicklung geeigneter Methoden zur Kultivierung bislang unkultivierter Mikroben und zur verbesserten *in situ* Erfassung physiologischer und ökologisch relevanter Daten voraus. Folglich wird es noch starker wissenschaftlicher Anstrengung bedürfen, um die mikrobiellen Prozesse im freien

Wasserkörper der Weltmeere und deren Folgewirkungen bis hin zu den globalen Auswirkungen auf das Klima unseres Planeten wenigstens annähernd zu verstehen.

Bis dahin werden noch einige Flocken des Meerschnees auf die Sedimente der Ozeane rieseln, zur Freude der Mikroorganismen tiefer Wasserschichten: Myriarden von Mikroorganismen in der Tiefe der Weltmeere leben von dem ewig absinkenden Meerschnee, einem Schneefall, der seit Urzeiten andauert und bis zum Ende allen Lebens auf unserer Erde anhalten wird.



## 5 Zusammenfassung

Ziele dieser Arbeit waren es, die taxonomische Struktur der mikrobiellen freilebenden und partikelgebundenen Biozönosen anhand von Probenmaterial aus dem westlichen Mittelmeer bei Nizza / Frankreich aufzuklären, marine Bakterienstämme aus Meerwasserproben zu kultivieren und mit molekularbiologischen Methoden zu charakterisieren, die Abundanz kultivierbarer mariner Bakterien zu bestimmen und *in situ* abundante mikrobielle Taxa mittels kultivierungsunabhängiger Ansätze zu identifizieren. Die Aufklärung der taxonomischen Struktur freilebender und partikelgebundener bakterieller Populationen sollte zur Identifikation mikrobieller Taxa dienen, die an Stoffumsätzen im Ökosystem maßgeblichen Anteil haben. Durch Kultivierung sollte der Versuch unternommen werden, ausgewählte Taxa für weitere physiologische Charakterisierung zu gewinnen.

Meerwasserproben des oberflächennahen Wasserkörpers und des Tiefenwassers bis 600 m Tiefe wurde Anfang April 1995 von zwei Stationen im westlichen Mittelmeer entnommen. Die Wasserkörper der küstennahen Station S1 und der küstenfernen Station S2 mit einer Entfernung von 10 km (S1) und 52 km (S2) waren durch die liguro – provincialische Strömung physikalisch voneinander getrennt. Hierbei repräsentierte die küstennahe Station S1 ein durch terrestrischen Nährstoffeintrag gekennzeichnetes meso – eutrophes Küstenhabitat und die küstenferne Station S2 ein oligotrophes Hochseehabitat. Meerwasserproben wurden durch Filtration fraktioniert, um partikelgebundene und freilebende bakterielle Lebensgemeinschaften getrennt untersuchen zu können.

### Kultivierungsabhängige Analysen

Insgesamt 227 Isolate wurden durch LMW – RNA – Profilanalyse charakterisiert. Eine hierarchisch aufgebaute Datenbank zur Klassifizierung der isolierten Stämme wurde entwickelt. Nach Gruppierung der Isolate aufgrund des Besitzes als identisch erachteter LMW – RNA – Profile in operationale taxonomische Einheiten (OTUs), wurden ausgewählte Vertreter der einzelnen OTUs durch Sequenzierung der 16S rRNA Gene identifiziert. Die 227 Isolate verteilten sich auf 56 OTUs, die jeweils einem der Taxa  $\alpha$  – Proteobakterien,  $\gamma$  – Proteobakterien, *Cytophaga* / *Flavobacterium*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* (Niedrig-GC) und *Fungi* (*Eukarya*) angehörten. Ergebnisse der kultivierungsabhängigen Charakterisierung waren:

- Die Diversität, gemessen nach Anzahl und Abundanz einzelner OTUs, war an Station S2 höher als an Station S1.
- Eine tiefenabhängige Verteilung einzelner OTUs wurde beobachtet.
- Die Diversität partikelgebundener Spezies, gemessen nach Anzahl und Abundanz einzelner OTUs, war höher als die Diversität freilebender Spezies.
- Von den 27 OTUs, bei denen mehr als ein einzelner Vertreter isoliert wurde, waren 8 OTUs mit Isolaten sowohl in der partikelgebundenen als auch in der freilebenden Fraktion vertreten.

- Kein Isolat entsprach zumindestens hinsichtlich der 16S rRNA-Gensequenz einem Typstamm einer bislang beschriebenen Art. Die Sequenzidentitäten zu beschriebenen Arten betrugen zwischen 93 % und 99%, wobei sich 16S rRNA Gensequenzen innerhalb einer RNA-Profil-OTU bis zu 3 % unterschieden.
- Eine exemplarische Charakterisierung von Isolaten, die dem Genus *Brevundimonas* angehören, zeigte eine gute Übereinstimmung von Unterschieden in LMW – RNA – Bandenmustern mit 16S rRNA – Gensequenzen und phänotypischen Merkmalen.

### Kultivierungsunabhängige Analysen

Die bakterielle Biomasse der Umweltproben ließ nur eine sehr geringe Menge an extrahierbaren Nucleinsäuren erwarten. Es erwies sich insbesondere für Analysen niedermolekularer RNAs als notwendig, möglichst über die gesamte extrahierbare Nucleinsäuremenge verfügen zu können, idealerweise mit der DNA und RNA einer Probe in zwei getrennten Fraktionen. Deswegen mußten Extraktionsmethoden so optimiert werden, daß DNA und RNA fraktioniert isoliert werden konnten und, daß sowohl Verluste als auch die Extraktionsselektivität minimiert wurden. Durch einen systematischen Vergleich verschiedener Extraktionsprozeduren und Detergenzien gelang es, eine Methode zu entwickeln, bei der aus einer Probe zunächst im sauren pH Bereich die RNA isoliert wurde und anschließend, durch Verschieben des pH - Wertes in den neutralen Bereich, die DNA fraktioniert extrahiert werden konnte. Die Extraktionseffizienz betrug für RNA und DNA etwa 20 % für einen gram – positiven Bakterienstamm und zwischen 50 % und 65 % für verschiedene gram – negative Referenzstämme und eine Teichwasserprobe. Die mit Hilfe dieser Methode gewonnenen Nucleinsäuren waren PCR – bzw. RT – PCR - fähig.

Mit Hilfe dieser Extraktionsmethode wurden RNA und DNA aus Umweltproben fraktioniert isoliert und die RNA – bzw. DNA – Konzentrationen bestimmt. Für die freilebende Fraktion lag der durchschnittliche DNA – Gehalt pro Zelle bei  $11,6 \pm 6,4$  fg / Zelle, der RNA – Gehalt bei  $13,8 \pm 12,9$  fg / Zelle. Mikroorganismen der partikelgebundenen Fraktion besaßen je Zelle  $3,3 \pm 3,6$  fg DNA und  $9,25 \pm 10,7$  fg RNA. Das RNA / DNA – Verhältnis der partikelgebundenen Fraktion betrug im Durchschnitt  $8,1 \pm 6,6$  und lag deutlich über dem Wert für die freilebende Fraktion,  $3,4 \pm 4,4$ . Die partikelgebundene Fraktion zeigte hiermit eine deutlich höhere Stoffwechselaktivität als die freilebende Fraktion.

DNA und RNA aus Meerwasserproben dienten als Ausgangsmaterial zur kultivierungsunabhängigen Charakterisierung der taxonomischen Struktur mikrobieller Biozönose. Änderungen im trophischen Status bakterieller Lebensgemeinschaften wurden durch Analysen der niedermolekularen RNAs aus Umweltproben erfaßt. Ausgehend von PCR – amplifizierten 16S rRNA Genabschnitten wurden mikrobielle Biozönosen durch DGGE – und SSCP – Analysen charakterisiert. Einzelne DGGE – Banden wurden ausgeschnitten und die durch diese Banden repräsentierten Taxa mit Hilfe von 16S rRNA Gensequenzierung bestimmt. 16S rRNA Gensequenzen von ausgeschnittenen DGGE – Banden und von Isolaten wurden mit partiellen 16S rRNA Gensequenzen aus einer Klonbank eines Kooperationspartners verglichen, welche im Rahmen derselben Ausfahrt aus Probenmaterial

der beiden untersuchten Stationen erstellt worden war. Folgende Schlußfolgerungen wurden aus den Ergebnissen der kultivierungsunabhängigen Analysen gezogen.

- Die Diversität war im oberflächennahen Wasser am höchsten und nahm mit zunehmender Tiefe ab.
- Partikelgebundene und freilebende bakterielle Fraktionen unterschieden sich grundlegend hinsichtlich ihrer taxonomischen Struktur.
- Die taxonomische Struktur der freilebenden Fraktion blieb sehr konstant, unabhängig von der betrachteten Station und der Tiefe. Eine Ausnahme bildeten die Proben aus 5 m Wassertiefe, dem unmittelbaren Oberflächenwasser. Die partikelgebundene Fraktion bestand aus einem konstanten Anteil, der aus eukaryotischen Algen gebildet wurde und einem variablen Anteil, der zwischen Probenmaterial aus verschiedenen Tiefen schwankte und offensichtlich aus Sukzessionen bakterieller Populationen bestand.
- Proben aus dem oberflächennahen Wasserkörper in 5 m Tiefe unterschieden sich in beiden Fraktionen deutlich vom Rest des Probenmaterials der betreffenden Fraktion. Offensichtlich waren im Oberflächenwasser als wichtigem Bildungsort mariner Partikel die partikelgebundene und die freilebende Bakterienfraktion noch nicht ausdifferenziert. Erst unterhalb des Oberflächenwassers differenzierten sich die beiden Fraktionen voneinander und wiesen unterschiedliche taxonomische Zusammensetzungen auf.
- Kultivierbare OTUs hoher Abundanz spielten *in situ* keine oder lediglich untergeordnete Rollen. *In situ* abundante Taxa konnten in der Regel nicht isoliert werden.

### Schlußfolgerung

Es wurde deutlich, daß die Zusammensetzung mikrobieller Populationen von den lokalen Gegebenheiten des Ökosystems diktiert wird, welches seinerseits allerdings durch mikrobielle Aktivitäten mitgeprägt wird. Im freien Wasserkörper mit zum Zeitpunkt der Probennahme weitgehend homogenen Bedingungen etablierte sich, unabhängig von Ort und Tiefe der Probennahme, eine freilebende bakterielle Fraktion stabiler und gleichförmiger Zusammensetzung. Demgegenüber wies bakterieller Aufwuchs auf partikelgebundenem Material, dessen Zusammensetzung mit Partikelalter und, damit mittelbar verbunden, Tiefe der Probennahme variierte, in der taxonomischen Struktur hohe Variationen auf. Der freie Wasserkörper der Weltmeere stellt offenbar für Mikroben einen heterogenen Lebensraum dar, dessen ökologische Nischen von taxonomisch unterschiedlichen Organismen ausgefüllt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abraham, W.-R., Meyer, H., Lindholst, S., Vancanneyt, M. & Smit, J. (1997). *Phospho- and sulfolipids as biomarkers of Caulobacter, Brevundimonas and Hyphomonas*. *Syst Appl Microbiol* **20**, 522 - 539.
- Abraham, W.-R., Strömpl C., Meyer H., Lindholst S., Moore, E. R. B., Christ R., Vancanneyt M., Tindall B.J., Bennasar A., Smit J. & Tesar, M. (1999). *Phylogeny and polyphasic taxonomy of Caulobacter species. Proposal of Maricaulis gen.nov. with Maricaulis maris (Poindexter) comb.nov. as the type species, and emended description of the genera Brevundimonas and Caulobacter*. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1053-1073.
- Acinas, S. G., Anton, J. & Rodriguez-Valera, F. (1999). *Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 514-22.
- Agaki, Y. & Taga, N. (1980). *Uptake of D-glucose and L-proline by oligotrophic and heterotrophic marine bacteria*. *Can. J. Microbiol.* **26**, 454-459.
- Allredge, A. L. (1976). *Discarded appendicularian houses as sources of food, surface habitats and particulate organic matter in planctonic environments*. *Limnol. Oceanogr.* **21**, 14-23.
- Allredge, A. L. & Gotschalk, C. C. (1990). *The relative contribution of marine snow of different origins to biological processes in coastal waters*. *Cont. Shelf Res.* **10**, 41-58.
- Allredge, A. L. & Silver, M. W. (1988). *Characteristics, Dynamics and Significance of Marine Snow*. *Proc. Oceanog.* **20**, 41-82.
- Allredge, H. & Cohen, Y. (1987). *Can microscale chemical patches persist in the sea ? Microelectrode study of marine snow, fecal pellets*. *Science* **235**.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
- Austin, B., Allen, D. A., Zachary, A., Belas, M. R. & Colwell, R. R. (1979a). *Ecology and taxonomy of bacteria attaching to wood surfaces in a tropical harbor*. *Can J Microbiol* **25**, 447-61.
- Austin, B., Calomiris, J. J., Walker, J. D. & Colwell, R. R. (1977). *Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria*. *Appl Environ Microbiol* **34**, 60-8.
- Austin, B., Garges, S., Conrad, B., Harding, E. E., Colwell, R. R., Simidu, U. & Taga, N. (1979b). *Comparative study of the aerobic, heterotrophic bacterial flora of Chesapeake Bay and Tokyo Bay*. *Appl Environ Microbiol* **37**, 704-14.
- Bahr, M., Hobbie, J. E. & Sogin, M. L. (1996). *Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster*. *Aquat. Microb. Ecol.* **11**.
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. H. (1992). *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer Verlag, New York.

- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M.** (1991). *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem.* **80**, 81-84.
- Baxter, M. & Sieburth, J. M.** (1984). *Metabolic and ultrastructural response to glucose of two eurytrophic bacteria isolated from seawater at different enriching concentrations. Appl Environ Microbiol* **47**, 31-8.
- Benlloch, S., Rodriguez-Valera, F. & Martinez-Murcia, A. J.** (1995). *Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rRNA PCR amplification and sequencing. FEMS Microbiol. Ecol.* **18**, 267-280.
- Bianchi, A. & Garcin, J.** (1994). *Bacterial response to hydrostatic pressure in seawater collected in mixed-water and stratified-water conditions. Marine Ecology Progress Series* **111**, 137-141.
- Bianchi, A. & Giuliano, L.** (1996). *Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 174-177.
- Bianchi, M.** (1996). *Mediterranean Targeted Project. European Microbiology of Particulate Systems. EMPS final report. Contract MAS2-CT94-0090.*, vol. 1 (ed. M. Bianchi).
- Biddanda, A.** (1985). *Microbial synthesis of macroparticulate matter. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **20**, 241 - 251.
- Biddanda, B. & Pomeroy, L. R.** (1988). *Microbial aggregation of phytoplankton derived detritus in seawater. I. Microbial succession. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **42**, 79 - 88.
- Bidle, K. D. & Fletcher, M.** (1995). *Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 944-952.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S. & McMeekin, T. A.** (1997). *Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl Environ Microbiol* **63**, 3068-78.
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. & Markey, L. A.** (1986). *Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 3746-3750.
- Britschgi, T. B. & Giovannoni, S. J.** (1991). *Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. Appl Environ Microbiol* **57**, 1707-13.
- Brock, D. A.** (1977). *Comparison of community similarity indices. J. Water Pollut. Control Fed.* **36**, 650-653.
- Burr, M. D. & Pepper, I. L.** (1997). *Variability in presence - absence scoring of AP PCR fingerprints affects computer matching of bacterial isolates. Journal of Microbiological Methods* **29**, 63-68.
- Cadee, G. C.** (1985). *Macroaggregates of Emiliana huxleyi in sediment traps. Marine Ecology - Progress Series* **24**, 193-196.
- Casamayor, E. O., Calderon-Paz, J. I., Mas, J. & Pedros-Alio, C.** (1998). *Identification of phototrophic sulfur bacteria through the analysis of lmwRNA band patterns. Arch. Microbiol.* **1998**, 269-278.
- Caspi, R., Haygood, M. G. & Tebo, B. M.** (1996). *Unusual ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes from a marine manganese-oxidizing bacterium. Microbiology* **142**, 2549-59.

- Chiari, M. & Righetti, P. G.** (1995). *New types of separation matrices for electrophoresis. Electrophoresis* **16**, 1815-1829.
- Chomczynski, P.** (1993). *BioTechniques* **15**, 532-537.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987). *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Cilia, V., Lafay, B. & Christen, R.** (1996). *Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Mol. Biol. Evol.* **16**, 451 - 461.
- Collins, M. D.** (1992). *The Genus Brevibacterium*. In *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. (ed. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer), pp. 1351-1353. Springer-Verlag, New York.
- Cooksey, K. E. & Wigglesworth - Cooksey, B.** (1995). *Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. Aquat. microb. Ecol.* **9**, 87-96.
- Costes, B., Girodon, E., Ghanem, N., Chassignol, M., Thuong, N. T., Dupret, D. & Goossens, M.** (1993). *Psoralen-modified oligonucleotide primers improve detection of mutations by denaturing gradient gel electrophoresis and provide an alternative to GC-clamping. Hum Mol Genet.* **2**.
- Crump, B. C., Armbrust, E. V. & Baross, J. A.** (1999). *Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. Appl Environ Microbiol* **65**, 3192-204.
- Davoll, P. J. & Silver, M. W.** (1986). *Marine snow aggregates: life history sequence and microbial community of abandoned larvacean houses from Monterey Bay, California. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **33**, 111-120.
- DeLong, E. F., Franks, D. G. & Alldredge, A. L.** (1993). *Phylogenetic diversity of aggregate attached vs. free-living marine bacterial assemblages. Limnol. Oceanogr.* **38**, 924-934.
- Demezas, D. H. & Bell, J.** (1995). *Evaluation of low molecular weight RNA profiles and ribotyping to differentiate some Bacillus species. Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 582-589.
- DeWachter, R., Neefs, J.-M., Goris, A. & Van de Peer, Y.** (1992). *The gene coding for small ribosomal subunit RNA in the basidiomycete Ustilago maydis contains a group I intron. Nucl. Acids Res.* **2**, 1251-1257.
- Distel, D. L., Lane, D. J., Olsen, G. J., Giovannoni, S. J., Pace, B., Pace, N. R., Stahl, D. A. & Felbeck, H.** (1988). *Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. J Bacteriol* **170**, 2506-10.
- Dominik, K.** (1997). *Vergleichende 5S rRNA-Analyse der zeitlichen und räumlichen Dynamik von Bakterioplankton aus dem Plußsee und anderen ostholsteinischen Seen.* Dissertation thesis, Technische Universität.
- Dominik, K. & Höfle, M. G.** (1999). *Extraction of total RNA from bacterioplankton.* In *Molecular Microbial Ecology Manual* (ed. A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. chap. 1.2.2.:1-9. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Engelen, B., Meineken, K., Wintzingerode, F. v., Heuer, H., Malkomes, H.-P. & Backhaus, H.** (1998). *Monitoring Impact of a Pesticide Treatment on Bacterial Soil*

- Communities by Metabolic and Genetic Fingerprinting in Addition to Conventional Testing Procedures. Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2814-2821.
- Farrell, R. E.** (1993). *RNA Methodologies. A Laboratory Guide for Isolation and Characterization.* Academic Press, San Diego.
- Felsenstein, J.** (1989). *PHYLIP - phylogeny inference package (version 3.2).* *Cladistics* **5**, 164-166.
- Felske, A., Rheims, H., Wolterink, A., Stackebrandt, E. & Akkermans, A. D.** (1997). *Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils.* *Microbiology* **143**, 2983-9.
- Field, K. G., Gordon, D., Wright, T., Rappe, M., Urback, E., Vergin, K. & Giovannoni, S. J.** (1997). *Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria.* *Appl Environ Microbiol* **63**, 63-70.
- Fitch, W. M. & Margoliash, E.** (1967). *Construction of phylogenetic trees.* *Science* **155**, 279-284.
- Fletcher, M.** (1984). *Comparative physiology of attached and free-living bacteria.* In *Microbial adhesion and aggregation.*, vol. 223 - 232 (ed. K. C. Marshall). Springer-Verlag, Berlin.
- Focht, D. D. & Vestraete, W.** (1971). *Biochemical ecology of nitrification and denitrification.* In *Advances in Microbial Ecology.*, vol. 135 - 214 (ed. M. Alexander). Plenum Press, New York.
- Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtshuk, P.** (1992). *How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 166-170.
- Freier, S. M., Kierzek, R., Jaeger, J. A., Sugimoto, N., Caruthers, M. H., Neilson, T. & Turner, D. H.** (1986). *Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **83**, 9373-9377.
- Fuhrman, J. A., Lee, S. H., Masuchi, Y., Davis, A. A. & M. Wilcox, R.** (1994). *Characterization of marine procaryotic communities via DNA and RNA.* *Microb. Ecol.* **28**, 133-145.
- Fuhrman, J. A., McCallum, K. & Davis, A. A.** (1993). *Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans [published erratum appears in Appl Environ Microbiol 1995 Dec;61(12):4517].* *Appl Environ Microbiol* **59**, 1294-302.
- Geiss, H. K., Piotrowski, H. D. & Hingst, V.** (1985). *Evaluation of API 20 NE in Routine Diagnostics of Nonfermenting Gram-Negative Rod-Shaped Bacteria.* *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A-Med.* **259**, 35-42.
- Gennari, M. & Tomaselli, S.** (1988). *Changes in aerobic microflora of skin and gills of Mediterranean sardines (Sardina pilchardus) during storage in ice.* *Int J Food Microbiol* **6**, 341-7.
- Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. & Field, K. G.** (1990). *Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton [see comments].* *Nature* **345**, 60-3.
- Giovannoni, S. J., Mullins, T. D. & Field, K. G.** (1995). *Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes.* In *I. Joint*, pp. 217-248. Springer, Berlin.

- Giovannoni, S. J., Rappe, M. S., Vergin, K. L. & Adair, N. L.** (1996). *16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the green non-sulfur bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 7979-7984.
- Giuliano, L., De Domenico, M., De Domenico, E., Höfle, M. & Yakimov, M. M.** (1999). *Identification of Culturable Oligotrophic Bacteria within Naturally Occurring Bacterioplankton Communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA Sequencing and Probing. Microb Ecol* **37**, 77-85.
- Gonzalez, J. M. & Moran, M. A.** (1997). *Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. Appl Environ Microbiol* **63**, 4237-42.
- Gonzalez, J. M., Moran, M. A., Whitman, W. B. & Hodson, R. E.** (1995). *Identification and characterization of ecologically relevant bacterial isolates growing on lignin-rich pulp mill wastes. Abstr.Gen.Meet.Am.Soc.Microbiol.* **95**, 473.
- Good, I. J.** (1953). *The population frequencies of species and the estimation of population parameters. Biometrika* **40**, 237-264.
- Gordon, D. A. & Giovannoni, S. J.** (1996). *Detection of stratified microbial populations related to Chlorobium and Fibrobacter species in the Atlantic and Pacific oceans. Appl Environ Microbiol* **62**, 1171-7.
- Gorsky, G., C. Aldorf, M.Kage, M.Picheral, Y.Garcia and J. Favole.** (1992). *Vertical distribution of suspended aggregates determined by a new underwater video profiler. Ann.Inst.Oceanogr. Paris.* **68**, 275-280.
- Gorsky, G., Guilbert, P. & Valenta, E.** (1989). *The autonomous image analyzer - enumeration, measurement and identification of marine phytoplankton. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **58**, 133-142.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C. & Huss, H. H.** (1990). *The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (Lates niloticus). Int J Food Microbiol* **10**, 303-16.
- Grimes, D. J., Singleton, F. L. & Colwell, R. R.** (1984). *Allogenic succession of marine bacterial communities in response to pharmaceutical waste. J Appl Bacteriol* **57**, 247-61.
- Gunn, B. A., Singleton, F. L., Peele, E. R. & Colwell, R. R.** (1982). *A note on the isolation and enumeration of gram positive cocci from marine and estuarine waters. J Appl Bacteriol* **53**, 127-9.
- Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R. & Noller, H. F.** (1985). *Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. Progr. Nucl. Acid Res. Molec. Biol.* **32**, 155-216.
- Haas, H.** (1997). *persönliche Mitteilung.*
- Hansen, J.** (1976). *Electrophoresis of ribonucleic acid on a polyacrylamide gel, which contains disulfide cross-linkages. Anal. Biochem.* **76**, 37-44.
- Heissenberger, A., Leppard, G. G. & Herndl, G. J.** (1996). *Relationship between the interacellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4521-4528.
- Henner, D. J. & Steinberg, W.** (1979). *Transfer Ribonucleic Acid Synthesis During Sporulation and Spore Outgrowth in Bacillus subtilis Studied by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Journal of Bacteriology* **140**, 555-566.



- Hennig, W.** (1950). *Grundzüge einer Theorie der Phylogenetischen Systematik*. Deutscher Zentralverlag, Berlin.
- Hennig, W.** (1982). *Phylogenetische Systematik*. Parey, Berlin, Hamburg.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E. M.** (1997). *Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3233-41.
- Höfle, M. G.** (1988). *Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach*. *J Microbiol Meth* **8**, 235-248.
- Höfle, M. G.** (1990a). *RNA chemotaxonomy of bacterial isolates and natural microbial communities*. In *Aquatic Microbial Ecology-Biochemical and Molecular Approaches* (ed. J. Overbeck and R. Chrost), pp. 129-159. Springer Verlag, Berlin.
- Höfle, M. G.** (1990b). *Transfer RNAs as genotypic fingerprints of eubacteria*. *Arch Microbiol* **153**, 299-304.
- Höfle, M. G.** (1992). *Aquatic microbial community structure and dynamics during large scale release of bacteria as revealed by low-molecular-weight RNA analysis*. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3387-3394.
- Höfle, M. G.** (1992a). *Rapid genotyping of Pseudomonas by using low-molecular-weight RNA profiles*. In *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology* (ed. E. Galli, S. Silver and B. Witholt), pp. 116-126. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Höfle, M. G.** (1998). *Genotyping of bacterial isolates from the environment using low-molecular-weight RNA fingerprints*. In *Molecular Microbial Ecology Manual* (ed. A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas and F. J. de Bruijn), pp. chap. 3.3.7. 1-23. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Höfle, M. G. & Brettar, I.** (1995). *Taxonomic diversity and metabolic activity in the water column of the central Baltic Sea*. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 868-874.
- Höfle, M. G. & Brettar, I.** (1996). *Genotyping of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea using Low-Molecular-Weight RNA profiles*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1382-1390.
- Hoppe, H. G.** (1984). *Attachment of bacteria: advantage or disadvantage for survival in the aquatic environment*. In *Microbial adhesion and aggregation*, vol. 283 - 301 (ed. K. C. Marshall). Springer-Verlag, Berlin.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R.** (1998). *Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity*. *J. Bacteriol.* **180**, 4765-4774.
- Hultling, C., Rosenlund, B., Tornblom, M., Sjöblom, P., Garoff, L., Nyman, C. & Hillensjö, T.** (1995). *Transrectal electroejaculation in combination with in-vitro fertilization: an effective treatment of anejaculatory infertility after testicular cancer*. *Hum Reprod* **10**, 847-50.
- Humble, M. W., King, A. & Phillips, I.** (1977). *API ZYM: A simple, rapid system for the detection of bacterial enzymes*. *J. Clin. Pathol.* **30**, 275-277.
- Hurlbert, S. H.** (1971). *The nonconcept of species diversity: a critique and alternate parameters*. *Ecology* **52**, 577-586.

- Jaccard, P.** (1908). *Nouvelles recherches sur la distribution florale*. Bull. Scoc. Vaud. Sci. Nat. **XLIV**, 223-269.
- Jeffrey, W. H., Haven, R. v., Hoch, M. P. & Coffin, R. B.** (1996). *Bacterioplankton RNA, DNA, protein content and relationships to rates of thymidine and leucine incorporation*. Aquat. Microb. Ecol. **10**, 87-95.
- Jensen, M. A. & Straus, N.** (1993). *Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions*. PCR Methods Applic. **3**, 186-194.
- Jones, D. & Keddle, R. M.** (1992). *The Genus Arthrobacter*. In *The Prokaryotes* (ed. T. H. G. Balows A., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H.), pp. 1283-1299. Springer-Verlag, New York.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R.** (1969). *Evolution of protein molecules* (ed. H. N. Munro), pp. 21-132. Academic Press., New York.
- Junge, K., Gosink, J. J., Hoppe, H. G. & Staley, J. T.** (1998). *Arthrobacter, Brachybacterium and Planococcus isolates identified from antarctic sea ice brine. Description of Planococcus mcmeekinii, sp. nov.* Syst Appl Microbiol **21**, 306-14.
- Kawasaki, E. S.** (1990). *Amplification of RNA*. In *PCR protocols - A guide to methods and applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White). Academic Press, San Diego.
- Keefe, T. J. & Bergersen, E. P.** (1977). *A simple diversity index based on the theory of runs*. Water Res. **11**, 689-691.
- Kingsbury, D. T.** (1969). *Estimation and genome size of various microorganisms*. J. Bacteriol. **98**, 1400-1401.
- Klingler, J. M., Stowe, R. P., Obenhuber, D. C., Groves, T. O., Mishra, S. K. & Pierson, D. L.** (1992). *Evaluation of the Biolog Automated Microbial Identification system*. Appl. Env. Microbiol. **58**, 2089-2092.
- Kocur, M., Kloos, W. E. & Schleifer, K. H.** (1992). *The Genus Micrococcus*. In *The Prokaryotes* (ed. T. H. G. Balows A., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H.), pp. 1300-1311. Springer -Verlag, New York.
- Kolodny, G. M.** (1984). *An improved method for increasing the resolution and sensitivity of silver staining of nucleic acid bands in polyacrylamide gels*. Anal. Biochem. **138**, 66-67.
- Kopczynski, E. D., Bateson, M. M. & Ward, D. M.** (1994). *Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms*. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 746-748.
- Lampe, A. S. & Van der Reijden, T. J. K.** (1984). *Evaluation of Commercial Test Systems for the Identification of Nonfermenters*. Eur. J. Clin. Microbiol. **3**, 301-305.
- Lane, D. J.** (1991). *16S/23S rRNA sequencing*. In *Nucleic Acids in Bacterial Systematics*. (ed. E. Stackebrandt and M. Goodfellow), pp. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- Lane, D. J., Harrison, A. P., Jr., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S. J., Olsen, G. J. & Pace, N. R.** (1992). *Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria*. J Bacteriol **174**, 269-78.

- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. S. & Pace, N. R. (1985). *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 6955-6959.
- Lee, H.-H., Zo, Y.-G. & Kim, S.-J. (1996). *Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP) . Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3112-3120.
- Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D. & Wilson, R. K. (1992). *DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. Nucleic Acids Res.* **20**, 2471-2483.
- Lee, S. & Kemp, P. (1994). *Single-cell RNA content of natural marine planktonic bacteria measured by hybridization with multiple 16S rRNA targeted fluorescent probes. Limnol. Oceanogr.* **39**, 869-879.
- Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V. & Shimkets, J. (1995). *Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1141 - 1143.
- Leifson, E. (1963). *J. Bacteriol.* **85**.
- Lidstrom, M. E. (1991). *The aerobic methylotrophic bacteria. In The Prokaryotes* (ed. H. G. T. A. Balows, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer), pp. 431-445. Springer-Verlag, New York.
- Liesack, W., Weyland, H. & Stackebrandt, E. (1991). *Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. Microbial Ecology* **21**, 191 - 198.
- Linley, E. A. S., Newell, R. C. & Bosma, S. A. (1981). *Heterotrophic utilization of mucilage released during fragmentation of kelp (Ecklonia maxima and Laminaria pallida). I. Development of microbial communities associated with degradation of kelp mucilage. Marine Ecology - Progress Series* **4**, 31-41.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, N., Bachleitner, M. & Schleifer, K. H. (1998). *Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis* **19**, 554-568.
- Maas, E. (1997). *unpublished data.* .
- MacFarlane, R. D., McLaughlin, J. J. & Bullock, G. L. (1986). *Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environments. J Wildl Dis* **22**, 344-8.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Parker Jr, C. T., Garrity, G. M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T. G., McCaughey, M. J., Olsen, G. J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M. & Woese, C. R. (1999). *A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Res.* **27**, 171-173.
- Majumdar, D., Avissar, Y. J. & Wyche, J. H. (1991). *Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: A new approach for isolating DNA. Biotechniques* **11**, 94-101.
- Mallory, L. M., Austin, B. & Colwell, R. R. (1977). *Numerical taxonomy and ecology of oligotrophic bacteria isolated from the estuarine environment. Can J Microbiol* **23**, 733-50.

- Mangan, J. A., Sole, K. M., Mitchinson, D. A. & P.D., B.** (1997). *An effective method of RNA extraction from bacteria refractory to disruption, including mycobacteria. Nucleic Acids Research* **25**, 675-676.
- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. & DeLong, E. F.** (1997). *Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. Appl Environ Microbiol* **63**, 50-6.
- Mau, M. K.** (1996). *16S rDNA-Sequenzanalyse und Sondendesign zur Charakterisierung der Bakterienpopulation im Sediment eines hochbelasteten Gewässers. 16S rDNA-Sequenzanalyse und Sondendesign zur Charakterisierung der Bakterienpopulation im Sediment eines hochbelasteten Gewässers. Dissertation thesis, Technische Universität Braunschweig.*
- McCave, I. N.** (1984). *Size spectra and aggregation of suspended particles in the deep ocean. Deep-Sea Research* **31**, 329-352.
- McCoy, W. F. & Olson, B. H.** (1985). *Fluorometric determination of the DNA concentration in municipal drinking water. Appl. environ. Microbiol.* **49**, 811-817.
- McIntosh, R. P.** (1967). *An index of diversity and the relation of certain concepts to diversity. Ecology* **48**, 392-404.
- Miller, J. M. & D.L., R.** (1991). *Preliminary Evaluation of Biolog, a Carbon Source Utilization Method for Bacterial Identification. J. Clin. Microbiol.* **29**, 1143-1147.
- Mitscherlich, E. A.** (1909). *Das Gesetz des Minimums und das Gesetz des abnehmenden Bodenertrages. Landwirsch. Jahrb.* **3**, 537-552.
- Mitskevich, I. N. & Kriss, A. E.** (1975). *[Vertical distribution of heterotrophic bacteria in the western half of the Indian ocean] LA - Rus. Mikrobiologiya* **44**, 498-504.
- Mitskevich, I. N. & Nikitina, E. P.** (1980). *[Vertical distribution of the saprophytic microflora in the southeastern portion of the Pacific Ocean]. Mikrobiologiya* **49**, 524-30.
- Mitsui, H., Gorlach, K., Lee, H. J., Hattori, R. & Hattori, T.** (1997). *Incubation time and media requirements of culturable bacteria from different phylogenetic groups. Journal of Microbiological Methods* **30**, 103-110.
- Monget, D.** (1978). *Mise au point d'une micromethode de detection et de mesure d'activities enzymatiques (API ZYM). Resultates obtenus dans differentes domaines d'application. These de Docteur-Ingenieur thesis.*
- Mullins, T. D., Britschgi, T. B., Krest, R. L. & Giovannoni, S. J.** (1995). *Genetic comparisons revealed the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. Limnol. Oceanogr.* **40**, 148-158.
- Murray, A. E., Preston, C. M., Massana, R., Taylor, L. T., Blakis, A., Wu, K. & DeLong, E. F.** (1998). *Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. Appl Environ Microbiol* **64**, 2585-95.
- Muyzer, G.** *persönliche Mitteilung.*
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoedes, C., Schäfer, H. & Wawer, C.** (1998). *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In Molecular Microbial Ecology Manual (ed. A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas and F. de Bruijn), pp. chap. 3.4.4 1-27. Kluwer Academic Press, Dordrecht.*

- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. & Wawer, C. (1995). *Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities*. In *Molecular microbial ecology manual*, vol. 2nd ed (ed. J. D. v. E. A. D. L. Akkermans, and F. de Bruijn). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Myers, R. M., Sheffield, V. C. & Cox, D. R. (1989). *Mutation detection by PCR, GC-clamps and denaturing gradient gel electrophoresis*. In *PCR-Technology - Principles and Applications for DNA Amplification*. (ed. E. H.A.), pp. 71-88. Stockton Press, New York.
- Nei, M. & Li, W.-H. (1979). *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5269-5273.
- Newell, R. C. & Turley, C. M. (1988). *Carbon and nitrogen flow through pelagic microheterotrophic communities*. In *South African Journal of Marine Science*, vol. 717-734 (ed. A. I. L. Payne, J. A. Gulland and K. H. Brinks). 5.
- Noble, P. A., Bidle, K. D. & Fletcher, M. (1997). *Natural microbial community compositions compared by a back-propagating neural network and cluster analysis of 5S rRNA*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1762-1770.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Stahl, D. A. & Pace, N. R. (1986). *Microbial ecology and evolution: A ribosomal approach*. *Annual Review of Microbiology* **40**, 337-365.
- Ortigosa, M., Garay, E. & Pujalte, M. J. (1997). *Gram-positive bacteria of marine origin: a numerical taxonomic study on Mediterranean isolates*. *Microbiologia* **13**, 453-62.
- Ott, J. (1996). *Meereskunde: Einführung in die Geographie und Biologie der Ozeane.*, 2. Neub. Auflage edition. Ulmer, Stuttgart.
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. L. & Olsen, G. J. (1986). *The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences*. In *Advances in Microbial Ecology*, vol. 9 (ed. K. C. Marshall), pp. 1-53.
- Parsons, T. R., Takahasi, M. & Hargrave, B. (1977). *Biological Oceanographic Processes*. Pergamon Press, New York.
- Paul, J. H. & Carlson, D. J. (1984). *Genetic material in the marine environment: Implication for bacterial DNA*. *Limnol. Oceanogr.* **29**, 1091-1097.
- Paul, J. H., Jeffrey, W. H. & DeFlaun, M. (1985). *Particulate DNA in subtropical oceanic and estuarine planktonic environments*. *Marine Biology* **90**, 95-101.
- Pearson, K. (1926). *On the coefficient of racial likeliness*. *Biometrika* **18**, 105-117.
- Pedrés-Alió, C. & Brock, T. D. (1983). *The importance of attachment to particles for planktonic bacteria*. *Arch. Hydrobiol.* **98**, 354-379.
- Peduzzi, P. & Herndl, G. J. (1991). *Decomposition and significance of seagrass leaf litter (Cymodocea nodosa) for the microbial food web in coastal waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea)*. *Mar. Ecol. prog. Ser.* **71**, 163 - 174.
- Pharmacia. *Automated Silver and Coomassie Staining of Polyacrylamide Gels*. Code No. 80-6343-34. .

- Phillips, C. J., Smith, Z., Embley, T. M. & Prosser, J. I.** (1999). *Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in the Northwestern Mediterranean Sea. Appl Environ Microbiol* **65**, 779-86.
- Pinhassi, J., Zweifel, U. L. & Hagstrom, A.** (1997). *Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. Appl Environ Microbiol* **63**, 3359-66.
- Rappé, M., Kemp, P. F. & Giovannoni, S. J.** (1997). *Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. Limnol. Oceanogr.* **42**, 811-826.
- Rath, J., Wu, K. Y., Herndl, G. J. & DeLong, E. F.** (1999). *High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. Aquat. Microb. Ecol.* .
- Raymond, S. & Weintraub, L.** (1959). *Science* **130**, 711.
- Reasoner, D. J. & Geldreich, E. E.** (1985). *A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1-7.
- Reysenbach, A.-L., Giver, L. J., Wickham, G. S. & Pace, N. R.** (1992). *Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3417-3418.
- Riebesell, U.** (1991a). *Particle aggregation during a diatom bloom. I. Physical aspects. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **69**, 273-280.
- Riebesell, U.** (1991b). *Particle aggregation during a diatom bloom. II. Biological aspects. Mar. Ecol. Prog. Ser.* **69**.
- Riebesell, U.** (1992). *The formation of large marine snow and its sustained residence in surface waters. Limnol. Oceanogr.* **37**(1), 63-76.
- Righetti, P. G.** (1983). . In *Isoelectric focusing: theory, methodology and applications* (ed. T. S. Work and R. H. Burdon). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Rüger, H.-J. & Krambeck, H.-J.** (1994). *Evaluation of the BIOLOG substrate metabolism system for classification of marine bacteria. Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 281-288.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M. & Christen, R.** (1994). *Phylogenetic analysis and assesment of the genera Vibrio, Photobacterium, Aeromonas and Plesiomonas, deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**.
- Ruimy, R., Fosset, C., Bianchi, M. & Christen, R.** (1997). *Bacterial diversity associated with particulate matter in the Mediterranean sea. An analysis of eubacterial 16S rDNA sequences obtained by PCR and molecular cloning. unpublished* .
- Rychlik, W. & Rhoads, R. E.** (1989). *A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization sequencing and in vitro amplification of DNA. Nuc. Acids Res.* **17**, 8543-8551.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. & Rhoads, R. E.** (1990). *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nuc. Acids Res.* **18**, 6409-6419.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

- Schmidt, J. L. (1980). *Evaluation d'une methode rapide d'assimilation des sucres (API 50 CH) en vue de l'identification des levures*. *Ann. Technol. agric.* **29**, 47-52.
- Schmidt, T. E., DeLong, E. F. & Pace, N. R. (1991a). *Analysis of marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing*. *J. Bacteriol.* **173**, 4371-4378.
- Schmidt, T. M., DeLong, E. F. & Pace, N. R. (1991b). *Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing*. *J. Bacteriol.* **173**, 4371-8.
- Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. & Gunkel, W. (1991). *Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea*. *Z Naturforsch [C]* **46**, 197-203.
- Schut, F., de Vries, E. J., Gottschal, J. C., Robertson, B. R., Harder, W., Prins, R. A. & Button, D. K. (1993). *Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance and characteristics of isolates under laboratory conditions*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2150-2161.
- Schwieger, F. & Tebbe, C. C. (1998). *A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4870-4876.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. & de Vos, P. (1994b). *Classification of Pseudomonas diminuta Leifson and Hugh 1954 and Pseudomonas vesicularis Büsing, Döll, and Freytag 1953 in Brevundimonas gen. nov. as Brevundimonas diminuta comb. nov. and Brevundimonas vesicularis comb. nov., Respectively*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 499 - 510.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. & De Vos, P. (1994a). *Classification of Pseudomonas diminuta Leifson and Hugh 1954 and Pseudomonas vesicularis Büsing, Döll, and Freytag 1953 in Brevundimonas gen. nov. as Brevundimonas diminuta comb. nov. and Brevundimonas vesicularis comb. nov., respectively*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 499-510.
- Shannon, C. E. & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication.*, pp. 19-27, 82-83, 104-107. The University of Illinois Press, Urbana, IL.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R. & Myers, R. M. (1989). *Attachment of a 40 - bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 232-236.
- Sieburth, J. M. (1987). *Contrary habitats for redox-specific processes: methanogenesis inoxic waters and oxidation in anoxic waters*. In *Microbes in the sea*. (ed. M. A. Sleight), pp. 11-38. Horwood Series in Marine Sciences, Ellis Horwood Limited.
- Silva, M. C. & Batt, C. A. (1995). *Effect of cellular physiology on PCR amplification efficiency*. *Mol. Ecol.* **4**, 11-16.
- Silver, M. W. & Briland, K. W. (1981). *Differential feeding and fecal composition of salps and pteropods, and the possible origin of the deep-water flora and olive-green cells*. *Mar. Biol.* **62**, 263-273.
- Simon, M., Alldredge, L. & Azam, F. (1990). *Bacterial carbon dynamics on marine snow*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **65**, 205 - 211.

- Simon, M. & Azam, F.** (1989). *Protein content and protein synthesis rates of marine planktonic bacteria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **51**, 201-213.
- Simpson, E. H.** (1949). *Measurement of diversity*. *Nature* **163**, 688.
- Sizemore, R. K., Colwell, R. R., Tubiash, H. S. & Lovelace, T. E.** (1975). *Bacterial flora of the hemolymph of the blue crab, Callinectes sapidus: numerical taxonomy*. *Appl Microbiol* **29**, 393-9.
- Slade, P. J. & Collins-Thompson, D. L.** (1991). *Differentiation of the genus Listeria from other Gram-positive species based on low molecular weight (LMW) RNA profiles*. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 355-360.
- Smetacek, V.** (1984). *The supply of food to the benthos*. In *Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems: Theory and Practice*. (ed. F. M.J.R.), pp. 517-548. Plenum Press, New York.
- Smetacek, V.** (1985). *Role of sinking in diatom life cycles: ecological, evolutionary and geological framework*. *Mar. Biol.* **84**, 239-251.
- Smetacek, V. & Pollehne, F.** (1986). *Nutrient cycling in pelagic systems: a reappraisal of the conceptual framework*. *Ophelia* **26**, 401-428.
- Smibert, R. M. & Krieg, N. R.** (1981). *General characterization*. In *Manual of Methods for General Bacteriology* (ed. M. Gerhardt, Costilow, Nester, Wood, Krieg and Phillips). American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Stachowitsch, M., Fanuko, N. & Richter, M.** (1990). *Mucus Aggregates in the Adriatic Sea: An Overview of Stages and Occurences*. *Marine Ecology* **11**, 327-350.
- Stackebrandt, E.** (1992). *The family Dermatophilaceae*. In *The Prokaryotes* (ed. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer), pp. 1346-1353. Springer-Verlag, New York.
- Stager, C. E. & Davis, R.** (1992). *Automated Systems for Identification of Microorganisms*. *Clinical Microbiology Reviews* **5**, 302-327.
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J. & Pace, N. R.** (1984). *Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences*. *Science* **224**, 409-411.
- Stahl, D. A., Lane, D. L., Olsen, G. R. & Pace, N. R.** (1985). *Characterization of Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1379-1384.
- Strömpl, C. & Moore, E. R. B.** (1999). *unveröffentlichte Daten*. .
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Herrmann, S., Struckmann, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. H. & Ludwig, W.** (1998). *ARB: a software environment for sequence data*. submitted for publication .
- Strunk, O., Gross, O., Reichel, B., May, M., Herrmann, S., Struckmann, N., Nonhoff, B., Lenke, M., Vilbig, A., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K. H. & Ludwig, W.** (1999). <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/>
- Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H. & Itakura, K.** (1981). *Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: Isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**, 6613-6617.
- Suzuki, M. T., Rappé, M. S., Haimberger, Z. W., Winfield, H., Adair, N., Ströbel, J. & Giovannoni, S. J.** (1997). *Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones*



- and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 983-989.
- Tesar, M., Hoch, C., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N.** (1996). *Westprinting: development of a rapid immunochemical identification for species within the genus Pseudomonas sensu stricto.* *Syst. Appl. Microbiol.* **19**, 577-588.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. & Ramsing, N. B.** (1996). *Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments.* *Appl Environ Microbiol* **62**, 1405-15.
- Turley, C. & Lochte, K.** (1990). *Microbial response to the input of fresh detritus to the deep-sea bed.* In *Geochemical Variability in the Oceans, Ice and Sediments.*, vol. 89. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology (Global and Planetary Change Section)* (ed. L. Labeyrie and C. Jeandel), pp. 3-23.
- Turley, C. M.** (1993). *Direct estimates of bacterial numbers in seawater samples without incurring cell losses due to sample storage.* In *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (ed. P. F. Kemp, B. Sherr, E. Sherr and J. J. Cole). Lewis Publishers, Boca Raton.
- Turley, C. M., Lochte, K. & Patterson, D. J.** (1988). *A barophilic flagellate isolated from 4500 m in the mid-north Atlantic.* *Deep Sea Res.* **38**, 403 - 413.
- Underhill, S. E. & Prosser, J. L.** (1987). *Surface attachment of nitrifying bacteria and their inhibition by potassium ethyl xanthate.* *Microbial Ecol.* **14**, 129 - 139.
- Urakami, T., Oyanagi, H., Araki, H., Suzuki, K. I. & Komagata, K.** (1990). *Recharacterization and Emended Description of the Genus Mycoplana and Description of two new Species, Mycoplana ramosa and Mycoplana segnis.* *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**, 434-442.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R.** (1994). *TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment.* *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570.
- Velazquez, E., Cruz Sanchez, J. M., Mateos, P. F. & Martinez Molina, E.** (1998). *Analysis of stable low-molecular-weight RNA profiles of members of the family Rhizobiaceae.* *Appl Environ Microbiol* **64**, 1555-9.
- Von Graevenitz, A. & Zollinger-Iten, J.** (1985). *Evaluation of Pertinent Parameters of a New Identification System for Non-Enteric Gram-Negative Rods.* *Eur. J. Clin. Microbiol.* **4**, 108-112.
- Ward.** (1963). *J. Am. Statist. Assoc.* **58**, 236-244.
- Washington, H. G.** (1984). *Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems.* *Water Res.* **18**, 653-694.
- Watve, M. G. & Gangal, R. M.** (1996). *Problems in Measuring Bacterial Diversity and a Possible Solution.* *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4299-4301.
- Weinbauer, M. G., Wenderoth, D. F., Fritz, I. & Höfle, M. G.** (2000). *High Efficient Extraction of Total RNA and DNA from Bacterioplankton Suitable for Community Structure Analyses.* manuscript in preparation .
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J.** (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.* *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.

- Weller, R., Walsh, T., Weller, J. & Ward, D. M.** (1991a). *16S rRNA sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA*. *Appl. Environ. Microbiol.* **Apr. 1991**, 1146-1151.
- Weller, R., Walsh Weller, J. & Ward, D. M.** (1991b). *16S rRNA Sequences of Uncultivated Hot Spring Cyanobacterial Mat Inhabitants Retrieved as Randomly Primed PCR*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1146-1151.
- Wenderoth, D. F. W.** *persönliche Mitteilung.* .
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J.** (1998). *Prokaryotes: The unseen majority*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 6578-6583.
- Whittaker, R. H.** (1952). *A study of summer foliage insect communities in the Great Smoky Mountains*. *Ecol. Monogr.* **22**, 1.
- Wiener, N.** (1948). *Cybernetics, or Control and Communication in the Animal and the Machine.*, pp. 10-11, 60-65. The M.I.T. Press, Cambridge, MA.
- Wright, T. D., Vergin, K. L., Boyd, P. W. & Giovannoni, S. J.** (1997). *A novel delta-subdivision proteobacterial lineage from the lower ocean surface layer*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1441-8.
- Youngbluth, M. J.** (1984). *Manned submersibles and sophisticated instrumentation: Tools for oceanographic research*. In *Proc. of SUBTECH, 1983*, pp. 335-344. Soc. of Underwater Technology, London.
- ZoBell, C. H. O. a. C. E.** (1952). *The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure*. *J.Mar.Res.* **11**, 10-18.
- Zwart, G., Hiorns, W. D., Methe, B. A., van Agterveld, M. P., Huismans, R., Nold, S. C., Zehr, J. P. & Laanbroek, H. J.** (1998). *Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria*. *Syst Appl Microbiol* **21**, 546-56.

## 7 Anhang

Im Folgenden werden weitere, im Rahmen der PICNIC – Ausfahrt des European Mediterranean Targeted Projects (EMPS) von beteiligten Arbeitsgruppen erhobene Daten aufgeführt. Nicht im Rahmen dieser Untersuchung erhobene Daten sind ausdrücklich als solche gekennzeichnet. Von Kooperationspartnern erhobenes Datenmaterial ist mit einem Vermerk auf den Urheber gekennzeichnet. Tabelle 36 enthält eine Zusammenstellung der Daten, die von allen beteiligten Arbeitsgruppen im Rahmen der PICNIC – Ausfahrt des EMPS – Projektes erhoben wurden. Tabelle 37 listet die Korrelationskoeffizienten aller Datensätze aus Tabelle 36 auf. Abbildung 86, Abbildung 87 und Abbildung 88 stellen ausgewählte Datensätze aus Tabelle 36 grafisch dar. Das Datenmaterial wird im Abschlußbericht des EMPS – Projektes ausführlich diskutiert (Bianchi, 1996).

Tabelle 36 (Seite 304 bis 309): Zusammenstellung des im Rahmen der PICNIC – Ausfahrten erhobenen Datenmaterials. Meßwerte für Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ], Salinität [Promille], Sauerstoffgehalt ( $\text{O}_2$ ) [ $\text{ml} \times \text{L}^{-1}$ ], Anzahl Partikel [ $\times \text{L}^{-1}$ ], Volumenkonzentration der Partikel [ppm], Massenkonzentration der Partikel [ $\mu\text{g}$  Partikelmasse  $\times \text{L}^{-1}$ ], durchschnittliche Partikellänge [mm], durchschnittlicher sphärischer Partikeldurchmesser [mm] und durchschnittliche Partikelfläche [ $\text{mm}^2$ ] von Dr. Gabriel Gorsky, Observatoire Zoologique Villefrance sur Mer, Frankreich. Meßwerte für Nitrit – ( $\text{NO}_2^-$ ), Nitrat – ( $\text{NO}_3^-$ ) und Ammonium – ( $\text{NH}_4^+$ ) – Konzentrationen erhoben von Dr. Patricia Bonin, Centre d' Oceanologie de Marseille, France; Leucin – Amino-peptidase – Aktivität (Substratkonzentration 10  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$ ; Abkürzungen: Leu-10  $\mu\text{M}$  und Leu-50  $\mu\text{M}$ ) [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ], Beta – Glucosidaseaktivität (Substratkonzentration 10  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$ , Abkürzungen: Beta-10 $\mu\text{M}$  und Beta-150 $\mu\text{M}$ ) [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] und N-Acetyl-Glucosaminidase (Chitinase) – Aktivität (Substratkonzentration 150  $\mu\text{M}$ , Abkürzung: NAG-150  $\mu\text{M}$ ) [ $\text{nmol MU L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] erhoben von Dr. Gerhard Herndl, Universität Wien; Aminosäure – und Glucose – Aufnahmeraten [ $\mu\text{g C L}^{-1} \text{h}^{-1} 10^3$ ], Chlorophyll – und Phaeophytin – Gehalt [ $\mu\text{g}$  Pigment  $\times \text{L}^{-1} \times 10^{-2}$ ] erhoben von Dr. Juan Iriberry Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spain; Daten zu Gesamtzellzahl [ $\times 10^8 \times \text{L}^{-1}$ ], Thymidin – und Leucin – Einbaurate [ $\text{pmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] erhoben von Dr. Carol Turley, Plymouth Marine Laboratory, United Kingdom; Daten zu Colony Forming Units (CFU) – Zahlen [ $\text{CFU ml}^{-1}$ ] wurden erhoben von Frank Ziemke für Triple – Sugar – Iron (Abkürzung TSI) – und  $\frac{1}{2}$  ZB +  $\text{NO}_3^-$  - Agarplatten (Abkürzung: Denit), von Ingo Fritz für MB – Agar (Abkürzung Hetero) und für Mineralsalz + Methanol – Medium (Abkürzung MeOH). Bei CFU – Zahlen symbolisiert die Abkürzung  $> 1 \mu\text{m}$  die partikelgebundene bakterielle Fraktion des Probenmaterials, die Abkürzung  $< 1 \mu\text{m}$  die freilebende Fraktion des Probenmaterials und total die gesamte bakterielle Fraktion (siehe für das methodische Vorgehen Abschnitt 2.1.3.1).

Tabelle 37 (Seite 310): Korrelationskoeffizienten aller erhobenen Meßreihen im Rahmen des Picnic-Cruises vom 31.03.1995 bis zum 10.04.1995. Abkürzung: nd, nicht definiert (Division durch Null); weitere Abkürzungen und Legende siehe Tabelle 38. Nicht in dieser Untersuchung erarbeitete Daten wurden erhoben von den Arbeitsgruppen von Dr. Gabriel Gorsky und Dr. Richard Christen, Observatoire Zoologique, Villefrance sur mer / Frankreich; Dr. Gerhard Herndl, Institut für Zoologie, Universität Wien, Österreich; Dr. Juan Iriberry, Departamento de Immunologia, Microbiologia y Parasitologia, Facultad de Ciencias, Universidad de Pais Vasco, Bilbao, Spanien; Drs. Armand und Micheline Bianchi, Laboratoire de Microbiologie Marine, Universite de la Mediterranee, Campus de Luminy, Marseille, Frankreich; Dr. Carol Turley, Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, Großbritannien.

Proben		Dr.Gabriel Gorsky, Observatoire Zoologique Villefrance s.M. / Fr.									
Datum	Station	Tiefe [m]	Temperatur [°C]	Salinität [Promille]	O <sub>2</sub> (ml/l)	Partikel / Liter	Volumenkon- zentration d.Partikel [ppm]	Massenkon- zentration der Partikel [µg Pts/l]	durchschn. Partikellänge [mm]	durchschn. sphärischer Durchmesser [mm]	durchschn. Fläche [mm <sup>2</sup> ]
31.03.95	1	5	13,12	38,11	6,22						
		40	13,02	38,14	6,08						
		220	13,10	38,33	5,43	51,43	3,09	141,80	0,59	0,35	0,14
		320	13,40	38,50	4,58	72,86	2,65	167,22	0,53	0,30	0,10
		400	13,50	38,56	4,30	45,71	2,41	111,94	0,54	0,31	0,12
		620	13,46	38,57	4,24	120,29	2,81	252,89	0,52	0,28	0,08
01.04.95		3									
		10	13,67	38,24	6,29						
		40	13,09	38,32	5,66						
02.04.95	2	5	13,00	38,32	5,66						
		60	13,08	38,41	5,19						
		230,5	13,17	38,47	4,82						
		302	13,37	38,54	4,31						
		401	13,41	38,56	4,18						
		602	13,23	38,51	4,33						
03.04.95	2	5,67	13,18	38,28	5,91						
		80	13,13	38,40	5,18	70,43	1,10	113,80	0,45	0,22	0,05
		110,4	13,12	38,42	4,72	69,43	0,97	114,50	0,45	0,22	0,05
		149,67	13,37	38,51	4,80	46,00	0,49	70,48	0,44	0,21	0,04
		261	13,36	38,54	4,28	19,715	0,42	31,01	0,44	0,21	0,055
		400	13,40	38,56	4,19	16,71	0,09	21,47	0,40	0,18	0,03
06.04.95	1	5	13,63	38,09	6,50						
		90,7	13,01	38,22	5,81	83,15	1,94	151,82	0,48	0,25	0,07
		131	13,03	38,30	5,59	46,79	0,645	79,83	0,46	0,23	0,055
		282,4	13,38	38,51	4,59	32,29	0,59	52,71	0,45	0,22	0,05
		398,5	13,48	38,57	4,25	57,65	1,08	107,01	0,48	0,25	0,06
		600,6	13,40	38,56	4,25	51,36	1,50	100,98	0,49	0,03	0,08

Proben		Dr. Gabriel Gorsky, Observatoire Zoologique Villefrance s.M. / Fr.									
Datum	Station	Tiefe [m]	Temperatur [°C]	Salinität [Promille]	O <sub>2</sub> (ml/l)	Partikel / Liter	Volumenkon- zentration d.Partikel [ppm]	Massenkon- zentration der Partikel [µg Pts/l]	durchschn. Partikellänge [mm]	durchschn. sphärischer Durchmesser [mm]	durchschn. Fläche [mm <sup>2</sup> ]
07.04.95	1	21	13,22	38,10	5,99						
		49	13,08	38,21	5,63						
		89	13,04	38,28	5,67	26,00	10,99	56,65	0,48	0,27	0,20
		140	13,14	38,38	5,26	67,22	0,58	97,99	0,42	0,2	0,04
		424	13,23	38,49	4,95	26,5	0,265	39,2	0,425	0,2	0,04
		708	13,36	38,54	4,26	57,07	0,79	95,77	0,455	0,225	0,05
08.04.95	2	6	14,33	38,22	6,30						
		101	13,17	38,43	4,87	39,43	0,74	70,74	0,48	0,24	0,06
		250	13,13	38,46	5,06	17,645	0,285	31,45	0,46	0,24	0,06
		400,67	13,29	38,52	4,45	8,57	0,53	15,98	0,46	0,24	0,09
09.04.95	1	42,5	13,00	38,10	6,02						
		204,5	13,05	38,28	5,36	13,57	0,52	31,11	0,53	0,30	0,10
		283	13,11	38,36	4,77	17,00	0,55	35,11	0,51	0,27	0,08
		362	13,11	38,44	5,02	27,07	2,11	80,92	0,61	0,37	0,165
		464,5	13,33	38,52	4,24	23,14	0,75	46,16	0,49	0,26	0,08
		600,5	13,44	38,56	4,13	50,57	1,72	124,77	0,56	0,32	0,10

Proben		Dr. Patricia Bonin					Dr. Gerhard Herndl, Universität Wien					Dr. Juan Iriberry, Univ. Bilbao, Spanien				
Datum	Stat- ion	Tiefe [m]	NO <sub>2</sub> [μM]	NO <sub>3</sub> [μM]	NH <sub>4</sub> [μM]	Leu-10μM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Leu- 150μM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Beta-10μM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Beta- 150μM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	NAG- 150μM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Aminosre - Aufnahme [μg C l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] x 10 <sup>-3</sup>	Glucose - Aufnahme [μg C l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] x 10 <sup>-3</sup>	Chloro- phyll [μg Chl/l] x 10 <sup>-2</sup>	Phaeo- phytin [μg Pheo/l] x 10 <sup>-2</sup>		
31.03.95	1	5	0,203	1,597	0		15,003		0,200	0,298	2,90	0,15	8,83	9,70		
		40	0,167	1,766	0		17,789		0,302	0,275	2,73	0,36	15,60	87,30		
		220	0,131	5,202	0		13,532		0,145	0,265	2,80	0,90	3,28	0,00		
		320	0,024	6,843	0		13,375		0,096	0,255	0,82	0,14	2,46	0,00		
		400	0,042	8,091	0		12,824		0,088	0,312	0,52	0,16	1,24	2,10		
01.04.95		3					12,114		0,073	0,210	0,30	0,09				
		10														
		40														
		5	0,095	3,505	0						6,67	0,70	23,80	56,70		
		60	0,167	5,433	0						3,46	0,32	16,60	59,70		
02.04.95	2	230,5	0,149	6,918	0						0,87	0,13	22,40	0,00		
		302	0,203	8,131	0						0,45	0,05	2,41	0,00		
		401	0,042	8,425	0						0,32	0,04	1,94	0,00		
		602	0,060	8,340	0						0,16	0,02				
		5,67	0,094	1,934							4,04	0,69	60,80	89,50		
03.04.95	2	80	0,214	7,197							1,73	0,18	8,81	27,40		
		110,4	0,294	6,805							1,16	0,31	9,29	17,60		
		149,67	0,094	6,303							0,67	0,09	2,38	0,00		
		261	0,154	9,208							0,30	0,03	2,42	0,00		
		400	0,114	9,248							0,19	0,02	2,01	0,00		
06.04.95	1	5	0,000	0,433		1,608	12,179	0,111	0,303		19,10	3,23	28,70	95,60		
		90,7	0,040	2,411		1,404	10,457	0,061	0,175		2,25	0,38	7,97	17,50		
		131				0,928	7,887	0,044	0,164		2,15	0,41	6,56	3,39		
		282,4	0,000	5,985		1,013	4,692	0,060	0,124		2,81	0,51	8,27	8,72		
		398,5	0,000	7,955		0,462	4,529	0,031	0,062		9,48	0,28	2,18	0,00		
		600,6	0,000	7,955		0,400	4,115	0,049	0,096		1,94	0,47				

Proben		Dr. Patricia Bonin			Dr. Gerhard Herndl, Universität Wien					Dr. Juan Iriberrí, Univ. Bilbao, Spanien					
Datum	Stat- ion	Tiefe [m]	NO <sub>2</sub> [µM]	NO <sub>3</sub> [µM]	NH <sub>4</sub> [µM]	Leu-10µM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Leu- 150µM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Beta-10µM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Beta- 150µM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	NAG- 150µM [nmol MU l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Aminosre - Aufnahme [µg C l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] x 10 <sup>-3</sup>	Glucose - Aufnahme [µg C l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] x 10 <sup>-3</sup>	Chloro- phyll [µg Chl/l] x 10 <sup>-2</sup>	Phaeo- phytin [µg Pheo/l] x 10 <sup>-2</sup>	
07.04.95	1	21	0,134	0,613		1,715	14,364	0,059	0,335		3,83	0,49	27,50	128,00	
		49	0,174	3,561		0,564	11,090	0,019	0,177		1,62	0,35	12,40	30,30	
		89	0,114	3,077		0,836	9,777	0,025	0,183		2,32	0,32	8,19	17,70	
		140	0,074	4,747		0,813	9,331	0,037	0,093		2,86	0,52	3,49	0,90	
		424	0,334	6,999		0,732	9,552	0,007	0,113		14,30	4,16	6,50	4,67	
		708	0,094	8,054		0,847	7,687	0,029	0,098		2,15	0,30			
08.04.95	2	6	0,014	0,665		2,243	10,734	0,102	0,340		12,00	2,61	63,90	110,00	
		101	0,014	6,437		0,496	9,015	0,034	0,086		0,74	0,20	2,20	0,00	
		250	0,334	6,252		0,479	9,033	0,049	0,137		1,66	0,23	9,72	11,60	
		400,67	0,174	6,616		0,323	7,385	0,027	0,076		9,64	0,12	4,51	2,17	
09.04.95	1	42,5									6,86	1,01			
		204,5													
		283	0,254	5,518								3,25	0,46		
		362													
		464,5													
600,5	0,094	8,054								7,63	1,24				

Proben		Dr. Carol Turley, Plymouth, GB										diese Untersuchung					
Datum	Stat- ion	Tiefe [m]	Zellen / l $\times 10^8$	Tdr [ $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]	Leu [ $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]	TSI total	TSI [>1 $\mu\text{m}$ ]	TSI [F]	Denit total	Denit [>1 $\mu\text{m}$ ]	Denit [F]	Hetero total	Hetero [>1 $\mu\text{m}$ ]	Hetero [F]	MeOH total	MeOH [>1 $\mu\text{m}$ ]	MeOH [F]
31.03.95	1	5	4,927	0,214	7,833	35,56	3,55	21,67				2538,00	54,00	1880,00	84,00	2,00	100,00
		40	6,738	0,585	8,118	31,11	0,44	35,00				120,00	2,00	90,00	11,00	0,00	22,00
		220	6,306	0,130	1,873	64,44	5,32	30,00	37,78	0,44	38,33	471,00	6,00	442,00	2,00	0,00	8,00
		320	2,698	0,088	0,532	64,44	2,22	36,67	48,89	0,67	33,33	193,00	4,00	120,00	27,00	1,00	25,00
		400	2,523	0,007	0,213	20,00	0,89	20,00	28,89	0,22	26,67	213,00	8,00	93,00	10,00	0,00	7,00
01.04.95		620	1,461	-0,005	0,149	17,78	1,33	5,00	17,78	0,00	15,00	204,00	3,00	310,00	16,00	1,00	5,00
		3				6,67	2,66	3,33				156,00	11,00	147,00	2,00	0,00	2,00
		10				15,56	1,77	13,33				176,00	13,00	125,00	2,00	0,00	2,00
02.04.95	2	40				777,80	314,80	450,00				2382,00	649,00	1100,00	601,00	81,00	187,00
		5	4,740	0,527	6,720	15,56	25,27	5,00	0,00	0,00	0,00	51,00	12,00	43,00	9,00	0,00	5,00
		60	4,558	0,331	2,952	120,00	1,33	136,67	0,00	0,00	0,00	696,00	14,00	217,00	36,00	0,00	27,00
		230,5	3,149	0,073	1,003	26,67	0,89	18,33	15,56	0,22	0,00	120,00	6,00	88,00	13,00	0,00	15,00
		302	2,354	0,031	0,887	17,78	8,42	16,67	0,00	0,22	0,00	309,00	11,00	338,00	9,00	3,00	12,00
03.04.95	2	401	1,735	0,023	0,425	97,78	22,61	70,00	2,22	0,22	0,00	578,00	9,00	192,00	47,00	1,00	10,00
		602	1,086	0,005	0,067	126,67	3,55	58,33	2,22	0,00	0,00	331,00	8,00	177,00	27,00	1,00	10,00
		5,67				106,67	151,00	70,00				131,00	61,00	78,00	73,00	5,00	52,00
		80				137,78	48,77	80,00				418,00	240,00	318,00	7,00	19,00	7,00
		110,4				53,33	67,39	53,33				224,00	82,00	178,00	58,00	3,00	50,00
06.04.95	1	149,67				75,56	40,79	78,33				298,00	38,00	278,00	27,00	1,00	18,00
		261				26,67	29,70	35,00				136,00	35,00	140,00	18,00	0,00	18,00
		400				73,33	103,74	30,00				144,00	68,00	120,00	22,00	4,00	17,00
		5	3,354	0,758	23,326	257,78	161,60	187,50				356,00	223,00	235,00	209,00	6,00	123,00
		90,7	2,904	0,403	4,109	188,89	71,38	165,00				449,00	124,00	373,00	142,00	3,00	102,00
		131	3,806	0,283	3,064	208,89	64,73	145,00				313,00	200,00	488,00	838,00	3,00	117,00
		282,4	2,995	0,107	2,344	317,78	64,73	238,33				898,00	128,00	402,00	138,00	2,00	83,00
		398,5	0,924	0,015	0,707	277,78	130,34	255,00				473,00	215,00	420,00	249,00	5,00	198,00
		600,6		0,003	0,282	164,44	50,54	188,33				316,00	104,00	238,00	136,00	1,00	88,00



Proben		Dr. Carol Turley, Plymouth, GB										diese Untersuchung					
Datum	Station	Tiefe [m]	Zellen / l $\times 10^8$	Tdr [pmol $l^{-1} h^{-1}$ ]	Leu [pmol $l^{-1} h^{-1}$ ]	TSI total	TSI [>1 $\mu m$ ]	TSI [F]	Denit total	Denit [>1 $\mu m$ ]	Denit [F]	Hetero total	Hetero [>1 $\mu m$ ]	Hetero [F]	MeOH total	MeOH [>1 $\mu m$ ]	MeOH [F]
07.04.95	1	21															
		49															
		89	3,950	0,439	2,615							293	13	287	176		
		140	2,640	0,010	1,068							602	52	497	322		
		424	2,909	0,225	1,571							471	13	600	244		
		708	1,023	0,023	0,223							358	7	282	122		
08.04.95	2	6	7,510	1,133	26,274							269					
		101	2,210	0,178	1,157							7360					
		250	3,570	0,149	1,967							338					
		400,67	2,240	0,062	1,078							716					
09.04.95	1	42,5	3,753									520					
		204,5	3,608									2253					
		283	3,054									250					
		362	2,213									1103					
		464,5	1,854									623					
		600,5	1,128									1123					

	Tiefe [m]	Temp [°C]	S [PSU]	O <sub>2</sub> [ml x L <sup>-1</sup> ]	Part.-kel [x L <sup>-1</sup> ]	Vol. Part. [ppm]	µg Part. x L <sup>-1</sup>	Part. Länge [mm]	Part. ESD [mm]	Part. Fläche [mm <sup>2</sup> ]	NO <sub>3</sub> [µM]	NH <sub>4</sub> [µM]	leu-10µM [50µM]	βGlc-150µM [150µM]	β-Glc-150µM [150µM]	NAG-150µM [50µM]	Aminosäure [50µM]	Glucose [µM]	Chlorophyll [µg/L]	Phaeo-phytin x 10 <sup>3</sup>	Zellen x 10 <sup>6</sup>	Tdr [h]	Leu [µmol/l]	TSS total [µm]	TSS [≥1 µm]	DN total [µm]	DN [≥1 µm]	MB total [µm]	MB [≥1 µm]	NMS total [µm]	NMS [≥1 µm]						
1	0.21	1																																			
	0.8	0.2	1																																		
	-0.85	-0.11	-0.95	1																																	
	0.08	0.15	0.02	0.01	1																																
	-0.15	-0.19	-0.32	0.33	0.11	1																															
	0.19	0.2	0.04	-0.03	0.94	0.23	1																														
	0.19	-0.05	-0.12	0.05	0.08	0.29	0.37	1																													
	-0.09	-0.19	-0.24	0.2	-0.01	0.27	0.21	0.72	1																												
	-0.02	-0.22	-0.28	0.25	-0.15	0.79	0.1	0.74	0.6	1																											
	-0.16	-0.46	-0.09	0.07	-0.4	-0.18	-0.44	-0.26	0.03	-0.14	1																										
	0.76	0.04	0.95	-0.96	-0.16	-0.49	-0.14	-0.11	-0.24	-0.4	0.05	1																									
	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1																									
	leu-10µM	0.57	-0.72	0.77	0.55	0.17	0.52	-0.17	0.29	-0.03	-0.31	-0.83	n.d	1																							
	leu-150µM	-0.47	-0.14	-0.61	0.57	0.35	0.3	0.5	0.61	0.72	0.41	0.24	-0.57	n.d	0.6	1																					
	βGlc-10µM	-0.45	0.65	-0.33	0.6	0.37	-0.18	0.41	0.3	-0.18	-0.18	-0.49	-0.66	n.d	0.78	0.29	1																				
	βGlc-150µM	-0.71	0.22	-0.87	0.88	-0.18	0.46	-0.16	0	0.14	0.36	0.06	-0.91	n.d	0.89	0.54	0.72	1																			
	NAG-150µM	-0.59	-0.21	-0.37	0.37	-0.91	-0.51	-0.96	0.41	0.54	0.7	0.45	-0.23	n.d	0.33	n.d	0.31	1																			
	Aminosäure	-0.16	0.36	-0.32	0.39	-0.26	-0.12	-0.24	-0.04	0.04	-0.02	-0.04	-0.4	n.d	0.36	-0.09	0.41	0.34	0.36	1																	
	Glucose	-0.12	0.36	-0.29	0.39	-0.15	-0.09	-0.14	-0.05	-0.03	-0.08	0.08	-0.34	n.d	0.44	0.04	0.33	0.36	0.04	0.85	1																
	Chlorophyll	-0.57	0.39	-0.51	0.62	0.08	0.17	-0.06	-0.23	-0.18	0.02	-0.15	-0.66	n.d	0.86	0.21	0.75	0.82	-0.04	0.41	0.4	1															
	Phaeophytin	-0.67	0.24	-0.71	0.72	0.3	0.31	0.17	-0.14	-0.1	0.13	-0.12	-0.78	n.d	0.85	0.46	0.71	0.94	-0.09	0.43	0.37	0.81	1														
	Zellen [x L <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> ]	-0.75	0.01	-0.71	0.78	-0.25	0.27	-0.16	0.16	0.21	0.32	0.19	-0.75	n.d	0.74	0.57	0.59	0.79	0.35	0.17	0.26	0.64	0.66	1													
	Tdr [µmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ]	-0.69	0.34	-0.77	0.83	-0.22	0.49	-0.23	-0.14	0.16	0.34	-0.07	-0.85	n.d	0.9	0.34	0.75	0.94	0.21	0.57	0.56	0.87	0.91	0.73	1												
	Leu [µmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ]	-0.57	0.57	-0.71	0.75	-0.19	0.18	-0.24	-0.2	0.13	0.08	-0.17	-0.79	n.d	0.87	0.3	0.88	0.88	0.38	0.67	0.61	0.87	0.87	0.59	0.9	1											
	TSS total	-0.1	-0.11	-0.12	0.16	-0.14	-0.34	-0.25	-0.27	-0.27	-0.31	-0.54	-0.14	n.d	0.12	-0.77	0.13	0.02	-0.05	0.52	0.42	0.05	0.11	-0.27	0.14	0.24	1										
	TSS [≥1 µm]	-0.22	-0.03	-0.19	0.23	-0.3	-0.67	-0.48	-0.66	-0.41	-0.68	-0.27	-0.27	n.d	0.37	-0.54	0.54	0.21	0.03	0.63	0.55	0.45	0.36	-0.24	0.38	0.56	0.86	1									
	TSS [TSS] [TSS]	-0.06	-0.05	-0.08	0.11	-0.13	-0.33	-0.24	-0.25	-0.4	-0.3	-0.51	-0.11	n.d	-0.39	-0.83	-0.22	-0.05	0.35	0.49	0.36	0.01	0.11	-0.24	0.11	0.18	0.96	0.81	1								
	DN total	0.12	0.28	-0.02	0.01	-0.53	0.05	-0.5	0.32	0.39	0.4	-0.39	-0.03	n.d	0.9	n.d	0.5	0.29	-0.21	0.21	-0.45	-0.52	0.21	-0.29	-0.32	-0.19	-0.46	-0.3	1								
	DN [DN]	-0.06	0.25	-0.01	-0.03	-0.52	0.09	-0.48	0.34	0.41	0.41	-0.13	0.11	n.d	0.9	n.d	0.52	0.27	-0.24	0.11	-0.6	-0.71	0.2	-0.28	-0.3	-0.07	-0.18	-0.17	0.82	1							
	DN [F]	0.11	0.25	-0.1	0.08	-0.78	0.31	-0.71	0.78	0.83	0.81	-0.36	-0.1	n.d	0.99	n.d.	0.86	0.48	-0.11	0.37	-0.56	-0.43	0.31	-0.23	-0.24	-0.17	-0.38	-0.27	0.94	0.72	1						
	MB total	-0.23	-0.24	-0.31	0.29	-0.07	-0.1	0.02	0.04	0	0.15	-0.31	n.d	0.05	0.11	-0.06	0.13	0.39	0.05	-0.04	-0.14	-0.14	0.18	-0.04	0.14	0.39	0.41	0.52	-0.23	-0.06	-0.09	1					
	MB [≥1 µm]	-0.22	-0.14	-0.2	0.24	-0.04	-0.47	-0.25	-0.46	-0.32	-0.5	-0.17	-0.16	n.d	0.2	-0.64	0.22	0.15	0.46	0.54	0.43	0.04	0.11	-0.18	0.29	0.43	0.93	0.88	0.87	-0.72	-0.47	-0.6	0.57	1			
	NMS total	-0.21	-0.25	-0.37	0.32	0.2	0.03	0.15	0.11	0.13	0	0.2	-0.32	n.d	-0.16	0.14	-0.62	0.11	0.3	0.04	-0.05	-0.18	-0.21	0.2	-0.04	0.14	0.39	0.26	0.33	0.1	0.12	0.29	0.93	0.43	1		
	NMS [F]	-0.14	-0.22	-0.22	0.23	-0.09	-0.28	-0.16	-0.16	-0.11	-0.21	-0.51	-0.28	n.d	-0.06	-0.42	-0.27	0.06	0.29	0.23	0.2	-0.02	-0.06	-0.04	0.15	0.13	0.7	0.6	0.68	-0.29	-0.1	-0.37	0.37	0.37	1		
	NMS total	-0.21	-0.2	-0.13	0.18	0.14	-0.24	-0.04	-0.35	-0.11	-0.36	0.19	-0.03	n.d	0.44	-0.39	0.46	0.23	-0.11	0.21	0.15	0.11	0.14	-0.36	0.25	0.5	0.85	0.79	0.72	-0.24	0.08	-0.23	0.62	0.9	0.42	0.52	1
	NMS [≥1 µm]	-0.12	-0.05	-0.26	0.24	-0.02	-0.25	-0.12	-0.18	-0.25	-0.36	-0.31	n.d	-0.28	-0.6	-0.3	0.05	0.4	0.58	0.37	0.05	0.06	-0.16	0.18	0.32	0.28	0.74	0.83	0.15	0.33	0	0.54	0.76	0.52	0.73	0.51	1

Beschriftung zu Tabelle 37 siehe Seite 303.

Tiefe [m]	Tiefe
Temp [°C]	Temperatur
S [PSU]	Salinität
O <sub>2</sub> [ml x L <sup>-1</sup> ]	Sauerstoffkonzentration
Partikel [x L <sup>-1</sup> ]	Anzahl Partikel pro Liter
Vol. Part. [ppm]	Volumenkonzentration der Partikel
µg Part. [µg x L <sup>-1</sup> ]	Partikelmasse pro Liter
Part. Länge [mm]	Durchschnittliche Partikellänge
Part. ESD [mm]	Durchschnittlicher sphärischer Partikeldurchmesser
Pt. Fläche [mm <sup>2</sup> ]	Durchschnittliche Partikeloberfläche
NO <sub>2</sub> [µM]	Nitritkonzentration
NO <sub>3</sub> [µM]	Nitratkonzentration
NH <sub>4</sub> [µM]	Ammonium-Konzentration
leu-10µM	Leucin-Aminopeptidase Aktivität (umgesetzte Substratmenge: nmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ) 10 µM Substratkonzentration
leu-150µM	Leucin-Aminopeptidase Aktivität (umgesetzte Substratmenge: nmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ) 150 µM Substratkonzentration
βGlc-10µM	β-Glucosidase Aktivität (umgesetzte Substratmenge: nmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ) 10 µM Substratkonzentration
βGlc-150µM	β-Glucosidase Aktivität (umgesetzte Substratmenge: nmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ) 150 µM Substratkonzentration
NAG-150µM	Chitinase-Aktivität (umgesetzte Substratmenge: nmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ) 150 µM Substratkonzentration
Aminosre	Aminosäure – Aufnahmerate [µg C L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] x 10 <sup>-3</sup>
Glucose	Glucose - Aufnahmerate [µg C L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] x 10 <sup>-3</sup>
Chlorophyll	Chlorophyll - Konzentration [µg x 10 <sup>-2</sup> x L <sup>-1</sup> ]
Phaeophytin	Phaeophytin - Konzentration [µg x 10 <sup>-2</sup> x L <sup>-1</sup> ]
Zellen [x L <sup>-1</sup> x 10 <sup>8</sup> ]	Anzahl prokaryotischer Zellen pro Liter
Tdr [pmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ]	<sup>3</sup> H Thymidin – Aufnahmerate
Leu [pmol x L <sup>-1</sup> x h <sup>-1</sup> ]	<sup>3</sup> H Leucin – Aufnahmerate
TSI total	CFUs pro ml Bakterien auf TSI - Agar, Gesamtfraktion; CFU = colony forming units
TSI [>1 µm]	CFUs pro ml Bakterien auf TSI - Agar, partikelgebundene Fraktion
TSI [F]	CFUs pro ml Bakterien auf TSI - Agar, freilebende Fraktion
DN total	CFUs pro ml denitrifizierende Bakterien, Gesamtfraktion
DN [>1 µm]	CFUs pro ml denitrifizierende Bakterien, partikelgebundene Fraktion
DN [F]	CFUs pro ml denitrifizierende Bakterien, freilebende Fraktion
MB total	CFUs pro ml Bakterien auf MB - Agar, Gesamtfraktion
MB [>1 µm]	CFUs pro ml Bakterien auf MB - Agar, partikelgebundene Fraktion
MB [F]	CFUs pro ml Bakterien auf MB - Agar, freilebende Fraktion
NMS total	CFUs pro ml Bakterien auf NMS+Methanol - Agar, Gesamtfraktion
NMS [>1 µm]	CFUs pro ml Bakterien auf NMS+Methanol - Agar, partikelgebundene Fraktion
NMS [F]	CFUs pro ml Bakterien auf NMS+Methanol - Agar, freilebende Fraktion

Tabelle 38: Legende zu den Abkürzungen in Tabelle 37.

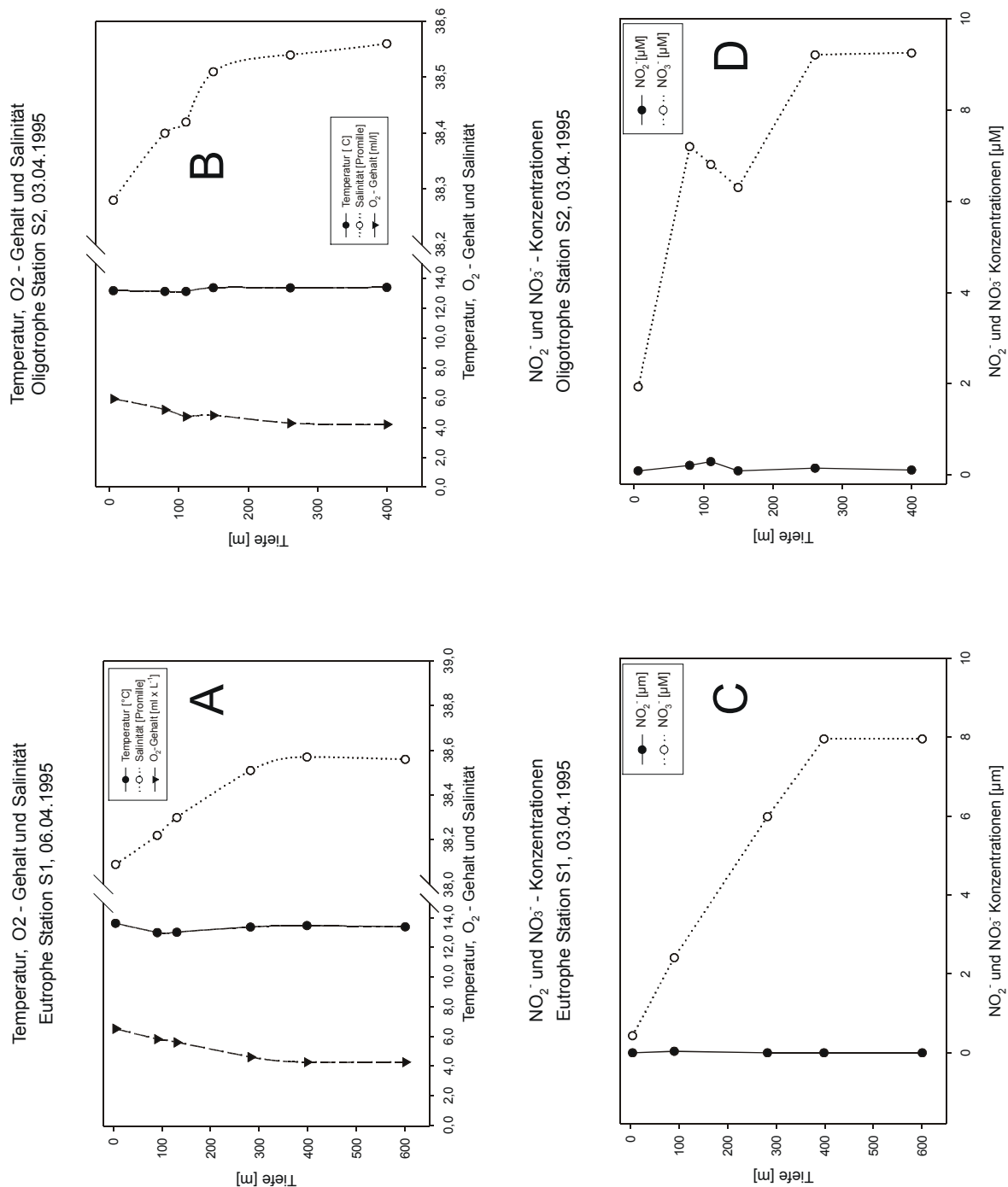


Abbildung 86: Graphische Darstellung physikalischer und chemischer Parameter zum Zeitpunkt der Probennahme. A und C: eutrophe Station S1; B und D: oligotrophe Station S2. A und B: Temperatur, Salinität und Sauerstoffgehalt an den Stationen S1 und S2. Daten von Dr. G. Gorsky (Observatoire Zoologique Villefrance sur mer, Frankreich). C und D: Nitrit – und Nitratkonzentrationen an den Stationen S1 und S2. Daten von P. Bonin (Centre d’Océanologie de Marseille, Frankreich). Daten sind aus Tabelle 36 entnommen. Die Darstellung des Sauerstoffgehaltes, der Temperatur und der Salinität beruht auf lediglich den sechs Datenpunkten der Probenahmetiefen, eine detailliertere Darstellung mit Meßpunkten im Abstand von jeweils zwei Metern findet sich in Abbildung 2.

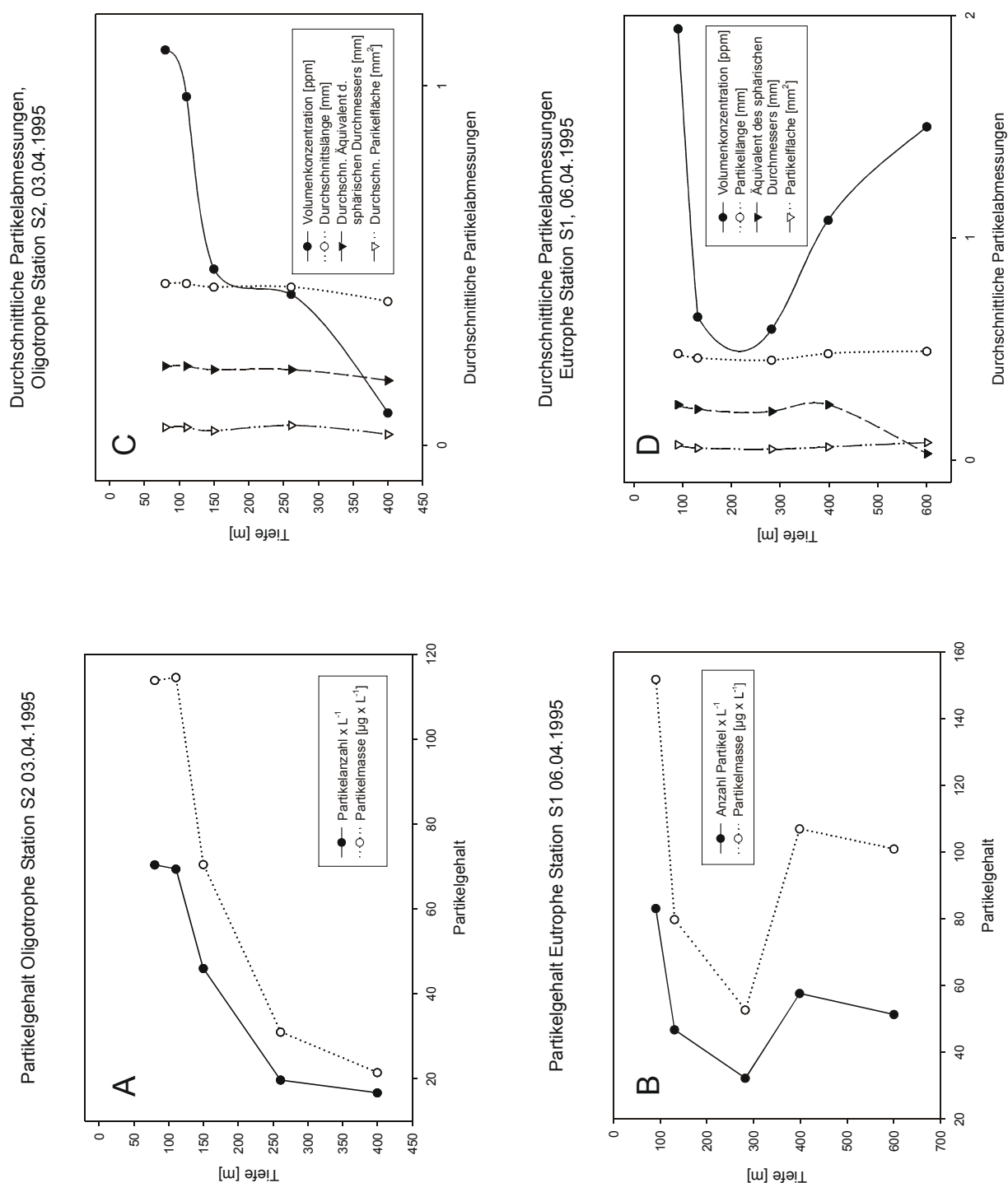


Abbildung 87: Graphische Darstellung des Partikelgehaltes und der Partikelabmessungen an den Stationen S1 und S2 zum Zeitpunkt der Probennahme. A und C: oligotrophe Station S2; B und D: eutrophe Station S2. A und B: Partikelanzahl und –masse; C und D: Partikelabmessungen an den Stationen S1 und S2. Daten von Dr. G. Gorsky (Observatoire Zoologique Villefrance sur mer, Frankreich). Daten sind aus Tabelle 36 entnommen. Die Darstellung der Partikelanzahl beruht auf lediglich den sechs Datenpunkten der Probenahmetiefen, eine detailliertere Darstellung mit Meßpunkten im Abstand von jeweils zwei Metern findet sich in Abbildung 2.

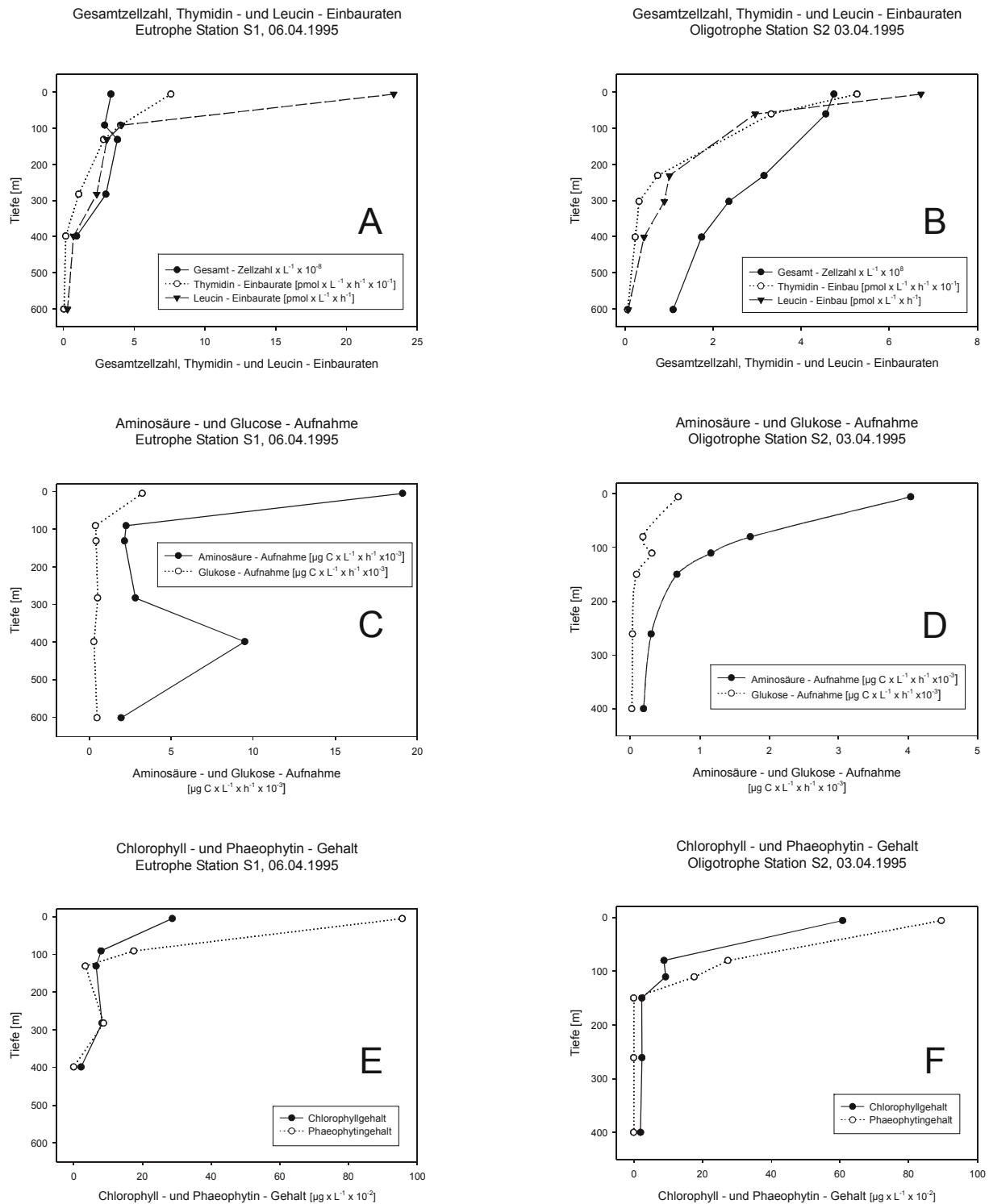


Abbildung 88: Biologische Parameter und Enzymaktivitäten an den Stationen S1 und S2 zum Zeitpunkt der Probennahme. A, C und E: eutrophe Station S1; B, D und F: oligotrophe Station S2. A und B: Gesamtzellzahl (DAPI – Counts), Thymidin – und Leucin – Einbaure an S1 und S2. Daten von C. M. Turley, J. R. W. Harris and E. Stutt (Plymouth Marine Laboratory, England). C und D: Aminosäure – und Glukose – Aufnahmeraten. E und F: Chlorophyll – und Phaeophytin-gehalt. C, D, E und F: Daten von J. Iriberry, M. Unanue und B. Ayo (Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spanien). Daten sind aus Tabelle 36 entnommen.

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	ausgeschriebenes Wort
% DG	Prozentsatz denaturierender Agenzien im Gradientengel
%IntOD	prozentualer Anteil der internen optische Dichte von Banden einer Gelspur
[%denat.]	Prozentsatz denaturierender Agenzien im Gradientengel
[v/v]	volume – volume (Volumen im Verhältnis zu Volumen)
[w/v]	weight – volume (Gewicht im Verhältnis zu Volumen)
[w/w]	weight – weight (Gewicht im Verhältnis zu Gewicht)
½ ZB	Modifiziertes ZoBell Nährmedium
16S RNA	Synonym für 16S rRNA
16S rRNA	rRNA eines Sedimentationskoeffizienten (S) von 16 Svedberg
23S RNA	Synonym für 23S rRNA
23S rRNA	rRNA eines Sedimentationskoeffizienten (S) von 5 Svedberg
5S RNA	Synonym für 5S rRNA
5S rRNA	rRNA eines Sedimentationskoeffizienten (S) von 23 Svedberg
A	Absorption
A230	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 230 nm
A260	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm
A280	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 280 nm
A320	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 320 nm
API	Produktname (Bio-Merieux, Nürtingen)
API 20 NE	Produktbezeichnung (Bio-Merieux, Nürtingen)
API 50 CH	Produktbezeichnung (Bio-Merieux, Nürtingen)
API Biotype 100	Produktbezeichnung (Bio-Merieux, Nürtingen)
APIZYM	Produktbezeichnung (Bio-Merieux, Nürtingen)
APS	Ammoniumpersulfat
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
AUX	Name einer Produktlinie (Bio-Merieux, Nürtingen)
BAC	N,N' – Bis(acryloyl)cystamin
BIOLOG	Hersteller- und Produktname (BioLog Inc., USA)
BIS	N,N' – Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CCUG	Culture Collection University of Göteborg, Schweden
cDNA	cDNA siehe auch copy DNA
CFB	Cytophaga / Flavobacterium / Bacteroides - Phylum
CFU	colony forming unit
CFUs	colony forming units (Pl.)
CIP	Collection of the Institut Pasteur, Paris, Frankreich
CL	complete linkage
const.	konstant
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
d	Tag (engl. day)
d.h.	das heißt
DAPI	4'6 – diamidino – phenylindol

<b>Abkürzung</b>	<b>ausgeschriebenes Wort</b>
ddNTP	Didesoxyribonucleotidtriphosphat
ddNTPs	Pl.: Didesoxyribonucleotidtriphosphate
DGGE	denaturierende Gradienten - Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
dNTPs	Pl.: Desoxyribonucleotidtriphosphate
dpi	dots per inch (Auflösung von Graphik - Dateien)
DS	in Datenbank (Genbank) enthaltene Sequenz
dsDNA	doppelsträngige DNA (double stranded)
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Deutschland
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Edward R. B. Moores Medium
EMPS	European Microbiology of Particulate Systems
Endkonz.	Endkonzentration
engl.	englisch
entspr.	entspricht
etc.	et cetera
EU	Europäische Union
EUP	euphotische Zone (Wasserkörper 5 m - 10 m Tiefe)
evtl.	eventuell
FF	freilebende Fraktion
Firmicutes LGC	Firmicutes mit niedrigem GC-Gehalt
Fkt.	Funktion
g	Gramm
G+C	Guanin + Cytosin (prozentualer Anteil des Genoms)
GBX	Produktname (Kodak, St. Louis, MO, USA)
ges.	gesättigt
GF/F	Glasfaser – Filter
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde (engl. Hour)
HCC	Hexaminkobaltchlorid
HCl	Salzsäure
IntOD	Interne optische Dichte von Banden einer Gelspur
JCM	Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan
kb	Kilobasen (= 1000 Basenpaare [bp])
Konz.	Konzentration
l	Liter
LMD	Laboratory of Microbiology, University Delft, Niederlande
LMG	Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien
LMW	low-molecular-weight (niedermolekular)
LMW-RNA	low molecular weight ribonucleic acids (niedermolekulare Ribonukleinsäuren)
LMW-RNA OTU	operational taxonomic unit definiert durch low-molecular-weight Ribonukleinsäureprofile
LMW-RNA Profil	densitometrisches Profil der niedermolekularen Ribonukleinsäuren
Lsg.	Lösung
MB	Marine Broth (Nährmedium Difco 2216)
MeOH	Methanol



---

<b>Abkürzung</b>	<b>ausgeschriebenes Wort</b>
min	Minute
MOF Medium	Modifiziertes Oxidations -Fermentations Medium
mRNA	Messenger (= Boten-) - Ribonucleinsäure
NB	Nutrient Broth Nährmedium
NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Schottland
NCMB	National Collection of Marine Bacteria, Aberdeen, Schottland
NMS	Nitrate Mineral Salts (synthetisches Nährmedium)
No.	Numero (= Nummer)
Nr.	Nummer
nt	Nucleotide [Anzahl]
NTP	Ribonucleotidtriphosphat
NTPs	Pl.: Ribonucleotidtriphosphate
o.ä.	oder ähnliches
o.g.	obengenannt
OB	Oberflächenwasser (Wasserkörper 30 m - 150 m Tiefe)
OD	optische Dichte
OD <sub>595</sub>	optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 595 nm
O-F Medium	Oxidations -Fermentations Medium
OTU	operational taxonomic unit
OTUs	operational taxonomic units (Pl.)
p.A.	per Analysis (Reinheitsgrad chem. Substanzen)
PAA	Polyacrylamid
PB	Punkt B
PC	Personal Computer (IBM - kompatibel)
pCp	Cytidin- 3',5'-Bisphosphat [5'- <sup>32</sup> P]
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PF	partikelgebundene Fraktion
Pl.	Plural
Pos	Position
PSC	Percentage Similarity Coefficient
rd.	rund
rDNA	rDNA siehe auch copy RNA
RDP	Ribosomal Database Project
red.	reduziert
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	reverse Transcriptase
RT - PCR	PCR von RNA ausgehend, mit reverser Transcriptase
S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLS	Natriumlaurylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA (single stranded)
Std.	Stunde
Susp.	Suspension
SYBR	Produktbezeichnung der Firma Molecular Probes Inc.
T1	Tiefenstufe 1 (Wasserkörper 200 m - 460 m Tiefe)

---

<b>Abkürzung</b>	<b>ausgeschriebenes Wort</b>
T2	Tiefenstufe 2 (Wasserkörper 600 m - 700 m Tiefe)
TBE2	Pufferbezeichnung (Tris - Borat - EDTA - Puffer)
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethyl - Ethylendiamin
TGGE	thermische Gradienten - Gelelektrophorese
TIFF	Tag Image File Format
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol
tRNA	Transfer - Ribonucleinsäure
TSI	Triple Sugar Iron (Nährmedium Difco)
unverd.	unverdünnt
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic averages
UV	ultraviolett
verd.	verdünnt
VS	zu vergleichende Sequenz
YO - PRO	Produktbezeichnung der Firma Molecular Probes Inc.
z.B.	zum Beispiel

## Danksagung

Wenn am Ende eines Weges alles getan ist, bleibt nur noch eines übrig: sich für die Hilfe zu bedanken, die man auf der Strecke empfangen hat. Sehr viele Leute haben dazu beigetragen, daß diese Doktorarbeit in dieser Form angefertigt werden konnte. So zahlreich die Personen sind, die ein Dankeschön verdient haben, so verschiedenartig sind die Beiträge zu dem vorliegenden „opus magnum“. Und im Laufe der Zeit haben so zahlreiche Leute für ihre Beiträge zu dieser Arbeit Dank verdient, daß ich nur hoffen kann, im nachfolgenden Abschnitt niemanden vergessen zu haben – wenn doch, tut es mir schon jetzt leid. Fangen wir einfach mal an:

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Mediterranean Targeted Project (MTP)-EMPS durchgeführt. Finanzielle Unterstützung wurde von dem Marine Science and Technology (MAST) - Programm der Europäischen Kommission unter dem Vertrag MAS2-CT94-0090 gegeben.

Für die Vergabe des Themas dieser Arbeit an mich und für das damit verbundene Vertrauen möchte ich mich bei dem Betreuer meiner Doktorarbeit, **Herrn Dr. habil. Manfred G. Höfle**, herzlichst bedanken. Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Kenneth N. Timmis**, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Abteilung an der GBF Braunschweig durchzuführen.

Ein großes Dankeschön an meine Kollegen in dem Labor, in dem ich meine Arbeit angefertigt habe, Labor D0.04 an der GBF Braunschweig. Ein besonderer Dank geht an **Frank Ziemke** für seine tatkräftige Mithilfe während der PICNIC – Ausfahrt im Frühjahr 1995 und an **Dr. Markus Weinbauer** für zahlreiche Diskussionen, Ideen, Vorschläge und jede Menge Spaß. Die wichtigste Person des Labores, **Silke Pretzer**, darf natürlich nicht unerwähnt bleiben, wenn auch der Platz auf dieser Seite leider nicht ausreicht, ihre Verdienste entsprechend zu würdigen. Weiterhin großen, herzlichen Dank an **Christiane Beckmann**, **Katja Dominik**, **Bert Engelen**, **Heike Haas**, **Martin Hahn**, **Birgit „Catwoman“ Jung**, **Eleftheria Katsivela**, **Karin Seikowsky**, **Michael Tesar**, **Dirk F. Wenderoth** sowie an **Beate Beyer**, **Karsten Kretschmer** und **Pia Weitlich**, not forgetting to mention „la bella“ **Laura Giuliano**.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch an das Labor von **Dr. Edward Moore** für wertvolle Hilfe und tatkräftige Unterstützung bei der 16S Sequenzierung zollen. Ohne Eure Hilfe wäre dies möglicherweise eine 5S – Arbeit geworden. Vielen Dank, **Susanne Baumgarte**, **Annette Krüger**, **Margit Mau** und **Carsten Strömpl**. Eine wirklich würdige Lobpreisung für Euch müßte sich an dieser Stelle über fünf Seiten erstrecken !

**Hung Tung Hsu** kriegt an dieser Stelle kein Dankeschön. Ständig hat mich dieser Nichtsnutz vom Arbeiten abgehalten und unter Androhung von roher Gewalt zum Herumschrauben an Computern gezwungen, die er vorher sicherlich selbst sabotiert hat ! Dafür gibt's an dieser Stelle Hieb und Stich mit einem glühenden Schraubenzieher.

Vielen Dank an **Michael Weiner** (Firma ATD, Braunschweig), der mir geholfen hat, den von **Hung Tung Hsu** angerichteten Schaden, so gut es ging, in Grenzen zu halten.

**Dr. Heinrich Lünsdorf** stand immer mit Rat und Tat zur Seite, auch wenn eventuelle Fragen manchmal noch gar nicht richtig ausformuliert waren. Vielen Dank, Heinrich, für wissenschaftliche Diskussionen und vor allem für wertvolle Unterstützung bei Licht – und Elektronenmikroskopie. **Dr. Wolf – Rainer Abraham** danke ich ebenfalls für interessante Diskussionen und wichtige Anregungen, besonders im Zusammenhang mit der Charakterisierung der *Brevundimonas* – Isolate.

Wichtig, wichtig: Ohne diese, meine von mir so sehr geschätzten Kollegen und Kolleginnen wäre die Arbeit an der GBF sicherlich mehr als ein gutes Stück weniger lustig gewesen: **Peter Wolff, Christian Hesse, Dagmar D. Wenderoth, Tanja Niepel, Ina Grammel, Ingrid Brümmer, Verena Heindl, Andrea Güttler, Antonia Toppel, Katrin Dinka, Dietmar Böltner und Dietmar Pieper** sowie die „Russen - Mafia“, **Dr. Peter Golyshin und Dr. Mikhail Yakimov**. Thanks also to the mediterranean fraction at the GBF, **Fabrizio Beltrametti, Daniela Reniero, Balbina Nogales, Raquel Sanjuan, Jean Armengaud SFB, Angeles Prieto Fernandez and Antonio Benassar**.

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei **Dr. Christoph C. Tebbe** (FAL, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) für das Ermöglichen der SSCP – Analysen in dieser Untersuchung und den Mitarbeitern seines Labors, **Susanne Bachmann, Jessica Niewint, Sabine Peters, Achim Schmalenberger und Frank Schwieger** für ihre wertvolle Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Analysen danken. Herrn **Dierk Dieter Strauss** danke ich für wertvolle Unterstützung bei den statistischen Berechnungen.

I would like to express my thanks to the participants of the EMPS project for the fruitful cooperation during the PICNIC and MIKEL cruise and thereafter. I would like to mention especially **Dr. Gabriel Gorsky**, mainly for all the help he supplied during the cruises, **Dr. Richard Christen** for help and advice concerning 16S rRNA and to **Dr. Richard Sempéré** for fun. Not forgetting to mention the other EMPS members:

Laboratoire de Microbiologie Marine, Marseille, France: **Micheline Bianchi, Armand Bianchi, Christine Fosset, Jean Garcin, Olivier Tholosan, Danielle Marty, France van Wambeke, Danièle Mazaudier, Clément Yoro and Lydie Ferrière**.

Centre d' Oceanologie de Marseille, France: **Patricia Bonin**.

Station Zoologique, Villefrance sur mer, France: **Lars Stemmann, Marc Picheral and Raymond Ruimy**.

Laboratoire d'Ecologie Animale de Liège: **Valérie Danckers**.

Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spain: **Juan Iriberry, Marian Unanue and Begoña Ayo**.

Plymouth Marine Laboratory, United Kingdom: **Carol Turley, John Harris and Ed Stutt**.

University of Aberdeen, Scotland: **Carol Philips and Jim Prosser**.

Institut für Zoologie, Universität Wien, Österreich: **Martin Agis, Markus Möseneder, Andreas Heissenberger und Gerhard J. Herndl**.

I liked a lot working with you and my big wish for the future would be, that all european citizens could experience what we have experienced: How Europe *could* be working. Thank you a lot for that.

I would also like to extend my thanks to the captain and the crew of the *RV Thetys II* for excellent service during the cruise.

Vielen Dank an **Jan Kunze** und **Ulrike Meyer** für Unterstützung und Spaß bei der Durchführung des MIKEL – Cruises in Villefrance / Frankreich.

Wenn man in eine fremde Stadt kommt, um dort eine neue Arbeit zu beginnen, ist es wichtig, wie man dort aufgenommen wird. Für einen guten Start in Braunschweig und Umgebung haben meine ehemaligen Mitbewohner und jetzigen Freunde gesorgt: **Henning Mann**, **Andreas Riekeberg**, **Mark „Magga“ Schmidt**, **Waldemar Sternol**, **Frank Wilder** und unsere WG – Katze **Mausi**. Ich habe mich mit Euch sehr wohl gefühlt und die Zeit mit Euch sehr genossen.

Ein großes Dankeschön an meine Eltern, **Helmut Fritz** und **Dr. Mathilde Lampe**, sowie an meine Tante, **Anita Fritz**, für moralischen Beistand und Unterstützung aus der Ferne. Euer Einverständnis mit meinen Entscheidungen war eine wertvolle Hilfe für mich. Vielen, vielen Dank dafür.

Und ein besonders großes Dankeschön an meine Freundin **Gabriela Misz**. Danke, Gabi, für Deine Geduld und Deine Nachsicht während der Anfertigung dieser Arbeit. Ohne Deinen Beistand hätte ich sicher nicht die Ruhe und die Kraft gefunden, die Arbeit in dieser Form zu Ende zu führen.

So, das wars. Genug gedankt. Fehlt noch jemand ? Ich hoffe, nein. Falls doch, bedanke ich mich hiermit blanko bei allen, deren Beiträge an dieser Stelle noch keine entsprechende Würdigung gefunden haben. Und nicht vergessen: Wer in der nächsten Danksagung erneut dabei sein will, muß, wie immer, dafür sorgen, daß die Überweisungen rechtzeitig bei meiner Bankverbindung eingehen. Und nicht vergessen: Entscheidend ist der Tag des Zahlungseingangs ...